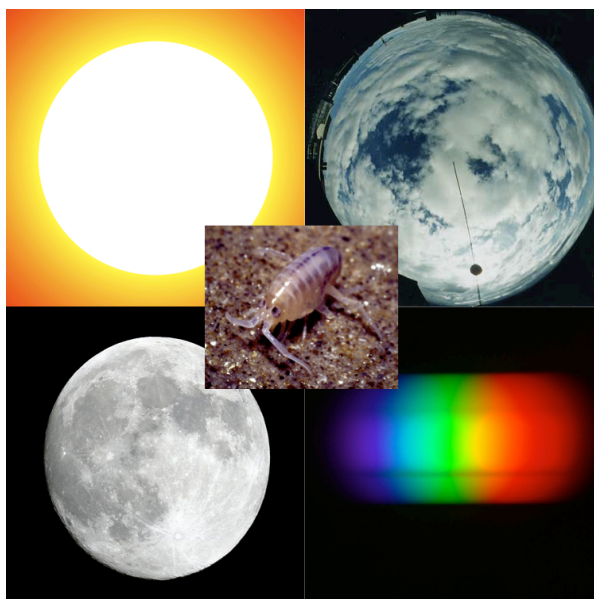


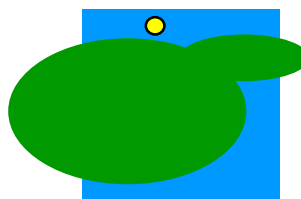
**DOTTORATO DI RICERCA IN
ETOLOGIA ED ECOLOGIA ANIMALE
(XXII CICLO)**

**Percezione e riconoscimento di fattori
orientanti astronomici e celesti in *Talitrus
saltator***

**Tesi di
Giuditta Galanti**



**Coordinatore Prof. Alberto Ugolini
Tutor Prof. Alberto Ugolini
2009**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA “L. Pardi”

**DOTTORATO DI RICERCA IN ETOLOGIA ED
ECOLOGIA ANIMALE
(XXII CICLO, BIO 05, BIO 07)**

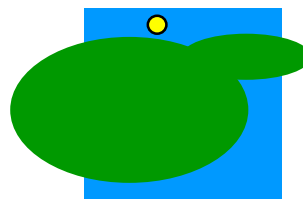
**Percezione e riconoscimento di fattori
orientanti astronomici e celesti in *Talitrus
saltator***

Tesi di

Giuditta Galanti

Coordinatore Prof. Alberto Ugolini

2009



INDICE

Riassunto	pag. 3
Introduzione	5
Ultraviolet-blue range photoresponses using the compound eye of the sandhopper, <i>Talitrus saltator</i> (Crustacea, Amphipoda)	27
Skylight polarization and compass orientation in sandhoppers: myth or reality?	45
Difference in skylight intensity is a new celestial cue for sandhopper orientation (Amphipoda, Talitridae)	61
Sensibilit� spettrale e specializzazione regionale dei pigmenti visivi in <i>T. saltator</i> : indagini comportamentali	75
Is it the sun or the moon?	95
Conclusioni generali	107

RIASSUNTO

L'anfipode sopralitorale *Talitrus saltator* (Montagu) compie periodiche migrazioni a scopo alimentare lungo l'asse mare – terra dei litorali sabbiosi sui quali vive. Per fare ritorno alla zona di elezione, seguendo la via più breve, i talitri utilizzano molti tipi di fattori orientanti, sia locali, sia generali.

I fattori orientanti astronomici e celesti, ed in particolare la luce polarizzata, rappresentano degli stimoli molto importanti per molte specie di artropodi (ad esempio api e formiche), nonostante ciò la loro percezione ed il loro eventuale utilizzo non è stato mai sufficientemente approfondito nei talitri. Così come non è stata approfonditamente indagata la relazione tra le capacità visive di *T. saltator* e la percezione dei fattori orientanti utilizzati da questa specie.

Pertanto ho ritenuto interessante prendere in considerazione: 1) la percezione da parte di *T. saltator* della luce UV 2) la possibilità che i talitri siano in grado di percepire, ed utilizzare il pattern di polarizzazione celeste. 3) la possibile regionalizzazione dei pigmenti visivi nell'occhio di questa specie 4) l'eventuale uso della disomogeneità dell'intensità luminosa del cielo nell'assumere la direzione ecologicamente efficace 5) il meccanismo alla base del riconoscimento dei principali fattori orientanti astronomici: sole e luna.

I risultati hanno mostrato che *T. saltator* è in grado di percepire la luce UV. Tuttavia resta da chiarire la relazione tra questa capacità e l'utilizzo di fattori orientanti celesti. La luce polarizzata sembra infatti essere percepita da *T. saltator*, tuttavia questa specie sembra non essere in grado di utilizzare il pattern di polarizzazione come riferimento orientante di tipo bussolare. Al contrario tra i fattori celesti il gradiente di intensità luminosa del cielo è un valido e nuovo riferimento orientante per i talitri e sembra costituire la base per l'identificazione di sole e luna.

I saggi comportamentali e le analisi morfologiche non hanno fornito chiare indicazioni circa la presenza di una regionalizzazione dei pigmenti visivi nei talitri, sembra tuttavia che la regione dorsale dell'occhio sia maggiormente sensibile verso le lunghezze d'onda corte.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

L'ORIENTAMENTO ATTRAVERSO STIMOLI VISIVI NEGLI ARTROPODI

Il sole

Santschi (1911) fu il primo a dimostrare l'utilizzo del sole come stimolo orientante attraverso esperimenti di deflessione dell'azimut solare mediante uno specchio. Durante questi saggi, schermato il sole vero, veniva mostrato agli animali il sole riflesso ad un azimuth diverso da quello reale per quell'ora del giorno, Santschi riuscì così a modificare la direzione di orientamento, in relazione al azimuth del sole riflesso, di un gruppo di formiche della specie *Messor barbarus* durante il loro meccanismo di homing, dimostrando che questa specie si orienta utilizzando il sole come riferimento. Successivamente l'importanza del sole come stimolo orientante è stata dimostrata in molte specie di vertebrati ed invertebrati.

Gli animali usano il sole in due modi diversi: come un riferimento fisso, oppure alcuni organismi possiedono un meccanismo cronometrico di compensazione del moto apparente del sole che si basa sulla presenza di un "orologio interno" che permette loro di compensare i movimenti che questo compie durante il giorno (si veda Able, 1980 per una revisione).

L'esistenza di un meccanismo di orientamento solare bussolare negli artropodi fu dimostrata per la prima volta da von Frisch (1950). Egli infatti dimostrò chiaramente che le api della specie *Apis mellifera* nel loro complesso meccanismo di foraggiamento utilizzavano il sole come stimolo orientante e che erano in grado di compensarne i cambiamenti di azimuth durante il giorno. Negli anni successivi la capacità di compensare il moto apparente del sole fu rilevata in molti gruppi di artropodi, tra i quali i ragni licosidi *Arctosa variana* e *Lycosa fluviatilis* (Papi e Tongiorgi, 1963), molte specie di insetti come le formiche *Formica rufa*, *Lasius niger* (Jander, 1957) e *Cataglyphis bicolor* (Wehner, 1972) ed in molti crostacei sia decapodi come *Goniopsis cruentata* (Schone, 1963) ed *Uca* spp (Hernikind, 1972) che anfipodi tra i quali *Talitrus saltator*, *Talorchestia* spp ed *Orchestia Mediterranea* (Pardi e Papi, 1953; Pardi, 1960).

L'utilizzo del sole come fattore orientante in *T. saltator* è stato dimostrato per la prima volta attraverso esperimenti di deflessione dell'azimut solare (analoghi a quelli effettuati da Santschi sulle formiche) (Pardi e Papi, 1953). Nei talitri il meccanismo cronometrico responsabile della regolazione dell'angolo con il sole può essere sfasato fino a essere completamente invertito, spostando nel tempo gli orari di alternanza luce-oscurità (Papi, 1955; Pardi & Grassi, 1955; Pardi, 1958). Saggi effettuati con animali esposti a inversione del ritmo nictiemerale, hanno rivelato un modello particolare di variazione dell'angolo solare notturno chiamato "*modello Talitrus*" (Pardi, 1954b) che è stato ritrovato anche in alcuni coleotteri (Pardi, 1958; Ercolini & Scapini, 1976a), emitteri (Birukow, 1956) e ragni (Tongiorgi, 1959), e che è diverso da quello presente nell'ape domestica ("*modello Apis*": Lindauer, 1954; 1957).

Esemplari di *T. saltator*, con ritmo invertito, si orientano rispetto al sole con un angolo che aumenta costantemente durante il giorno, mentre i controlli, al contrario, si orientano con un angolo che diminuisce nel corso della giornata. Nei talitri è possibile quindi evidenziare due cicli di compensazione del moto apparente del sole: uno diurno e uno notturno che procede in senso inverso rispetto al primo. Infatti, di notte, gli esemplari di *T. saltator* si comportano come se il sole, dopo il tramonto, ripercorresse il cammino compiuto durante il giorno in senso inverso, cioè con moto apparente da Ovest verso Est passando per il Sud. Da questi saggi emerge inoltre un'ulteriore evidenza, ovvero che i talitri erano in grado di riconoscere il sole come tale anche durante la loro notte soggettiva, tuttavia il meccanismo alla base di questo riconoscimento non è stato mai chiarito. Inoltre con esperimenti di filtraggio spettrale è stato osservato che, se il sole è visibile, è riconosciuto come tale soltanto se si consente agli animali la visione delle radiazioni con $\lambda < 500$ nm, cioè della componente blu dello spettro; a $\lambda > 500$ nm la visione del sole induce soltanto una risposta fototattica positiva (e.g. il sole non viene riconosciuto come tale) (Ugolini et al, 1996).

In laboratorio, con condizioni di illuminazione di cielo e sole artificiali, utilizzando un apparato sperimentale che ricrea uno scenario comparabile con quello naturale (per una dettagliata descrizione si veda Ugolini et al. 1998) i talitri mostrano un orientamento corrispondente a quello che si ottiene in natura esponendoli al sole. Questo tuttavia si verifica soltanto se vengono utilizzate intensità luminose maggiori di $1,13 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ per il sole e maggiori di $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ per il cielo (Ugolini et al. 1998). Simili esperimenti condotti su individui adulti dell'isopode litorale *Tylos europaeus* hanno evidenziato che il sole artificiale è riconosciuto come riferimento orientante solo per intensità di sole e cielo superiori a $0,4$ e $1,3 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ rispettivamente (Ugolini & Castellini, 2004). Come rilevato anche per *Talitrus saltator* (Ugolini et al. 1998) quando il cielo artificiale non è illuminato, gli animali mostrano soltanto un comportamento fototattico positivo.

La luna

La luna rappresenta un potenziale stimolo orientante per tutti gli animali che si muovono durante la notte. Tuttavia il suo utilizzo come riferimento orientante può risultare molto problematico in quanto è visibile durante la notte soltanto per una parte del suo ciclo ed inoltre subisce notevoli variazioni di forma e di orario.

Durante la notte, inoltre, la luna compie variazioni azimutali molto più ampie rispetto al sole; ed in notti successive, assume azimut diversi a orari corrispondenti, dato che sorge ogni giorno con 50 minuti di ritardo rispetto al giorno precedente, causando così una differenza di azimut di circa 12° (Papi e Pardi, 1953; Papi, 1960; Enright, 1972). Utilizzare la luna implica inoltre possedere un orologio interno in fase con il ciclo lunare.

In *T. saltator* e in altri anfipodi sopralitorali, è stata dimostrata sperimentalmente l'esistenza di un meccanismo di orientamento cronometrico basato sull'utilizzo della luna (Papi & Pardi, 1953; Enright, 1972). Il picco di attività di *T. saltator* si verifica maggiormente di notte, quando l'animale effettua migrazioni nell'interno della spiaggia alla ricerca di cibo (Williamson, 1951; Ercolini, 1960; Geppetti & Tongiorgi, 1967); da qui l'idea che fosse necessario un meccanismo che permettesse agli animali di mantenere la DTF costante anche durante le ore notturne.

I talitri sono stati i primi, tra i pochi invertebrati, nei quali è chiaramente dimostrata la coesistenza di una bussola lunare con una solare (Ugolini et al. 1999 a, b). Per dimostrare sperimentalmente che la luna è realmente il fattore orientante utilizzato da *T. saltator* durante la notte, sono stati eseguiti classici esperimenti di deflessione dell'azimut lunare con uno specchio (analoghi a quelli effettuati con il sole) (Papi & Pardi, 1953; Papi & Pardi, 1954; Enright 1972; Ugolini et al. 2002) che mostrano come gli animali mantengano rispetto alla luna riflessa, lo stesso angolo mantenuto con la luna vera. I talitri conservano inalterato il meccanismo di orientamento anche se tenuti in cattività in condizioni molto diverse da quelle naturali (Pardi & Papi, 1953). Inoltre, saggiando in condizioni di luna piena animali tenuti per 11-20 giorni al buio nel periodo precedente l'esperimento, questi mostrano di orientarsi correttamente (vedere Enright 1972; Papi & Pardi 1959; Ugolini et al., 1999b). Tale risultato ha indotto a pensare che il meccanismo cronometrico della bussola lunare abbia base endogena.

Rilasciando gruppi di giovani nati in laboratorio e mai esposti prima del saggio al cielo naturale, in condizioni di luna piena e in assenza della componente orizzontale del campo magnetico terrestre, gli individui si orientavano nella direzione attesa per i genitori, se questi provenivano dalla stessa spiaggia di origine, e direzione intermedia tra quelle dei genitori se questi provenivano da spiagge diversamente orientate (Ugolini et al., 2002). È stato dimostrato inoltre, che l'utilizzo della luna come fattore orientante è indipendente dal campo magnetico terrestre (Ugolini et al. 1999). Esperimenti effettuati durante due eclissi di luna il 5 agosto 1952 ed il 16 settembre 1997, dimostrarono come una considerevole alterazione della forma del disco lunare (con riduzione dell'intensità luminosa) non produceva variazioni rilevanti nell'orientamento (Pardi & Papi, 1953; Ugolini et al., 1999). Individui adulti e giovani inesperti non presentavano infatti significative variazioni nell'orientamento se saggiati nel momento in cui era visibile soltanto metà luna rispetto o alla fine dell'eclissi.

In *T. saltator* la bussola solare e quella lunare, si basano su meccanismi cronometrici separati (Ugolini et al. 1999b); è infatti possibile indurre uno sfasamento dell'orientamento lunare, mantenendo inalterato quello solare (Ugolini et al. 1999b). L'esistenza di due orologi interni, solare e lunare, ha

fatto supporre una capacità in *T. saltator* di distinguere tra due diversi fattori orientanti astronomici.

Così come avviene per l'orientamento solare è possibile riprodurre un orientamento lunare in laboratorio utilizzando l'apparato sperimentale, già citato per gli studi di orientamento solare, che produce uno scenario simile a quello naturale (in condizioni di cielo e luna artificiali) (Ugolini et al. 1998).

Saggiando di notte in fase di plenilunio, sia individui adulti che giovani inesperti di *T. saltator*, si osserva come entrambi siano in grado di utilizzare la luna artificiale come quella naturale, indipendentemente dall'intensità di illuminazione del cielo e della luna artificiali (Ugolini et al. 2005). Inoltre, la capacità di orientamento nei saggi di notte non varia apprezzabilmente anche quando le intensità di illuminazione di cielo e luna, corrispondono alle intensità utilizzate, di giorno, per il sole (Ugolini et al. 2005).

I RIFERIMENTI CELESTI

La luce polarizzata

Com'è noto in natura non esiste alcuna fonte diretta di luce polarizzata; la luce polarizzata presente deriva infatti indirettamente da due sorgenti: dalla diffusione della luce solare nell'atmosfera e nell'idrosfera, e dalla riflessione della luce da parte di superfici lucide, non metalliche e dielettriche come ad esempio le masse d'acqua, il suolo e la vegetazione. Nel passaggio attraverso l'atmosfera terrestre la luce solare viene infatti deviata da molecole o particelle di piccole dimensioni, in modo tale che in ogni punto del cielo le sue onde tendono a vibrare in una sola direzione. A causa di tali fenomeni di diffusione una parte consistente di luce solare viene così parzialmente polarizzata (Menzel, 1974; Brines e Gould, 1982; Wehner, 1989; Tovee, 1995; Eguchi, 1999). Ogni raggio di sole parzialmente polarizzato presenta una direzione di vibrazione predominante (orientamento del vettore 'e') perpendicolare al piano dell'angolo di incidenza.

Il pattern di polarizzazione del cielo varia in relazione alla posizione del sole, infatti attorno ad esso si formano una serie di anelli concentrici (vettori 'e') che possono fornire agli organismi, in grado di percepirli, informazioni preziose sulla posizione del sole quando questo non è visibile (Waterman, 1981; Wehner, 1989; Tovee, 1995; Eguchi, 1999). Il vettore 'e', ovvero la direzione della polarizzazione, è sempre perpendicolare al piano rappresentato da un triangolo che ha per vertici il sole, l'osservatore e il punto del cielo osservato da quest'ultimo (Fig. 1).

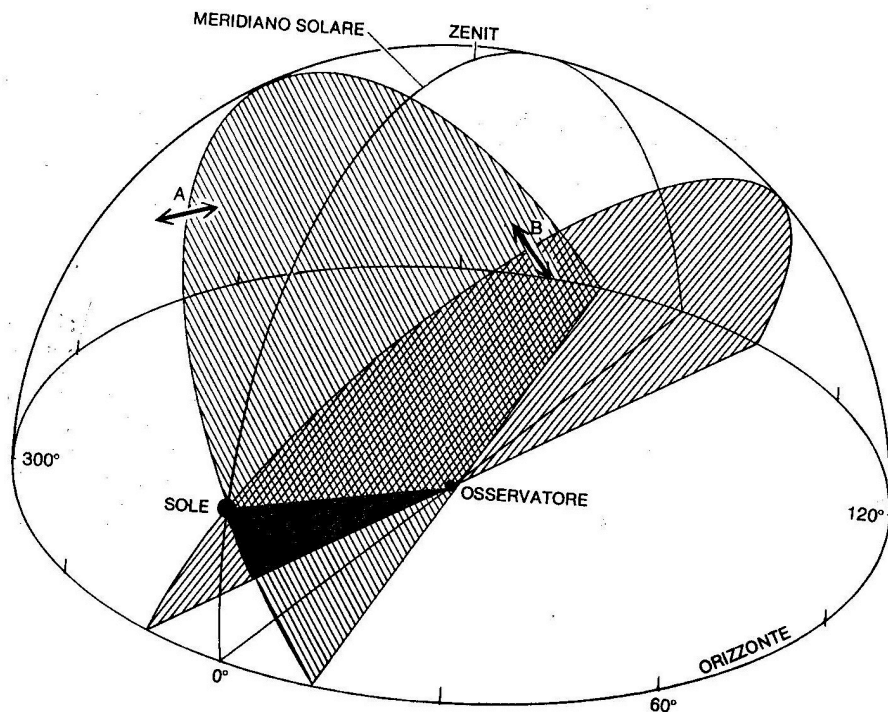


Figure 1 L'asse di polarizzazione della luce del cielo (due frecce corte a doppia punta) è sempre perpendicolare al piano di un triangolo formato dall'osservatore (al centro), dal sole e dal punto del cielo osservato. L'esempio in figura si riferisce a due punti: A e B. I piani dei cerchi che passano attraverso il sole e ciascuno dei due punti sono tratteggiati. Il grande cerchio che passa attraverso il sole e lo zenit è il meridiano solare (da Wehner, 1976, modificato).

Il pattern di polarizzazione del cielo è caratterizzato dalla presenza di una fascia di massima polarizzazione che si localizza a 90° dal sole, pertanto in corrispondenza dell'alba e del tramonto (quando il sole è basso sull'orizzonte) questa banda è alta sulla verticale (zenit) lungo il meridiano celeste che si trova a 90° rispetto a sole e antisoletto (punto opposto al sole sulla sfera celeste). A mezzogiorno con il sole a $60-70^\circ$ di altezza, la fascia di massima polarizzazione raggiunge la minima altezza sull'orizzonte (per un approfondimento si veda Waterman, 1981).

La polarizzazione è massima a 90° dal sole (70% della luce) e decresce in entrambe le direzioni (Menzel, 1974). Esistono cinque punti del cielo in cui la luce non è polarizzata: 1) il sole; 2) il punto di Babinet (20° sopra il sole); 3) Il punto di Brewster (20° sotto il sole); 4) l'antisoletto; 5) il punto di Arago (20° sopra l'antisoletto) (Menzel, 1974).

La polarizzazione della luce celeste è notevolmente ridotta in presenza di foschia e di nubi. Tuttavia in presenza di nubi irregolari il grado di polarizzazione della luce nelle aree di cielo sgombre da nuvole è identica a quella che si avrebbe con un cielo sereno (Waterman, 1981; per una revisione Horváth e Varjú, 2004).

Molti organismi, sia vertebrati che invertebrati sono in grado di percepire ed utilizzare la luce polarizzata come stimolo orientante. I primi studi sull'argomento, effettuati su *Apis mellifera* da von Frisch (1949), dimostrarono come le api fossero in grado di percepire il piano di polarizzazione (vettore 'e') della luce del cielo ed utilizzare questa informazione come riferimento orientante quando la visione diretta del sole non era loro possibile. Nei decenni successivi molti studi sulla stessa *A. mellifera* (Zolotov e Frantsevich, 1973; Menzel e Snyder, 1974; Edrich e Van Helversen, 1976; Van der Glass, 1976; Rossel et al. 1978; Rossel e Wehner, 1982, 1986; Wehner e Strasser, 1985) e su altre specie di Artropodi, sia Crostacei che insetti, accomunati dalla presenza di un meccanismo di orientamento basato sulla bussola solare (per una revisione Horváth e Varjú, 2004), hanno messo in luce il meccanismo alla base della percezione e dell'utilizzo del pattern di polarizzazione celeste. Si vedano in proposito anche i numerosi ed approfonditi studi effettuati da Wehner su due specie di formiche del deserto *Cataglyphis bicolor* e *Cataglyphis fortis* (Duelli e Wehner, 1973; Wehner, 1992).

Nonostante la luce del cielo risulti polarizzata in tutto lo spettro luminoso, alcuni animali, come *A. mellifera*, *C. bicolor* e *Danaus plexippus* utilizzano solo la luce con lunghezza d'onda inferiore a 430 nm (*A. mellifera*), 410 nm (*C. bicolor*) e 400 nm (*D. plexippus*) (Duelli e Wenher, 1973; Menzel e Snyder, 1974; Waterman, 1981; si veda anche Stalleicken et al., 2005;). Dal momento che la fascia di massima polarizzazione è l'area del cielo con la massima intensità relativa di radiazioni blu e ultraviolette (Menzel, 1974; Brines e Gould, 1979) e che il disturbo atmosferico influenza la luce ultravioletta dieci volte meno rispetto alle lunghezze d'onda maggiori (Von Frisch, 1967) è evidente che percepire la luce polarizzata nell'UV permette di massimizzare l'utilizzo del pattern di polarizzazione celeste come stimolo orientante anche in condizioni di cielo nuvoloso (UV-Sky-Pol Paradox) (Horváth e Varjú, 2004).

La percezione della luce polarizzata nelle api avviene tramite gli ommatidi situati nel margine dorsale dell'occhio composto (DRA, dorsal rim area) (Wehner e Strasser, 1985). Ogni ommatidio è composto da otto cellule fotorecetrici disposte a cerchio a formare un lume occupato da un rabdomero (composto dalle espansioni macrovillari di ogni cellula fotorecetrica). L'insieme dei rabdomeri di ogni recettore forma l'unità fotorecetrica di ogni ommatidio. Tali cellule recetrici presentano una sensibilità alla luce verde, blu e in parte anche alla luce ultravioletta. Le api possiedono inoltre un'altra cellula (R9), più corta rispetto alle altre, sensibile esclusivamente alla luce ultravioletta, che sembra in larga parte responsabile della loro sensibilità alla luce polarizzata;

i recettori verdi e blu si sono infatti dimostrati poco sensibili alla polarizzazione (Menzel e Snyder, 1974).

Microvilli di cellule R9 di ommatidi vicini hanno un diverso orientamento, in tal modo le informazioni provenienti da diversi ommatidi possono essere integrate, inoltre l'orientamento dei microvilli delle cellule R9 è uguale specularmente nei due occhi (Menzel, 1974).

Studiando gli errori compiuti da *A. Mellifera* durante esperimenti in cui veniva saggiata la capacità di orientamento delle api mostrando loro soltanto delle aree di cielo con il sole a diverse elevazioni (da 58 a 63°), è stato sperimentalmente dimostrato che la disposizione dei microvilli delle cellule R9 delle aree dorsali nei due occhi composti costituisce un modello di riferimento semplificato ed innato della configurazione del pattern di polarizzazione del cielo. Le api sono in grado di confrontare le informazioni provenienti dal cielo con questo modello derivando così l'orientamento dei meridiani solare ed antisolare (Rossel e Wehner, 1982, 1986; Wehner, 1989).

L'esistenza di un'area composta da recettori sensibili alla luce polarizzata (DRA), funzionalmente simile a quella presente in *A. mellifera*, è stata dimostrata attraverso studi elettrofisiologici, anche nell'occhio di *D. plexippus* e di *Gryllus campestris* (Labhart et al., 1984); sono stati individuati, inoltre, in quest'ultima specie neuroni (pol-neuroni) che ricevono informazioni da un gruppo di ommatidi specializzati situati nell'area dorsale (chiamata anche pol-area alla luce della sua specifica funzione). Attraverso esperimenti nei quali venivano coperte con la vernice aree diverse degli occhi di *G. campestris* è stata dimostrata la sua sensibilità alla luce polarizzata e l'uso del pattern di polarizzazione celeste come stimolo orientante (Brunner e Labhart, 1987).

La sensibilità alla luce polarizzata in *C. bicolor* è stata ampiamente dimostrata da Wehner e collaboratori (Duelli e Wehner, 1973; Wehner, 1992). Modificando il pattern di polarizzazione del cielo con l'ausilio di filtri polarizzatori veniva saggiata la capacità delle formiche di ritornare al formicaio, dal quale venivano passivamente allontanate, utilizzando come unico stimolo orientante l'azimut solare. Gli animali si dimostravano completamente disorientati quando il sole non era loro visibile, mentre riuscivano ad orientarsi quando veniva permessa loro la visione dell'astro. Tuttavia gli individui che dimostravano la migliore capacità di orientarsi erano quelli a cui era consentito vedere il pattern di polarizzazione celeste reale, questo risultato evidenziò la fondamentale importanza della luce polarizzata celeste come fattore orientante nel recupero zonale di *C. bicolor*. Fu dimostrata inoltre la totale incapacità delle formiche di percepire la luce polarizzata con lunghezze d'onda superiori a 410 nm, ipotizzando, anche per questi animali, il coinvolgimento di recettori UV nella percezione della luce polarizzata (per una revisione si veda Horváth e Varjú, 2004). Sono stati eseguiti inoltre studi, sia comportamentali che di natura elettrofisiologia, che hanno evidenziato la presenza di una regione dorsale dell'occhio (DRA) di *C. bicolor* (Wehner, 1976) ricca di recettori UV molto sensibili alla luce polarizzata (Labhart, 1986).

Recentemente è stato ipotizzato che anche insetti migratori quali locuste (Homberg, 2004; Mappes e Homberg, 2004) e lepidotteri (come la già citata farfalla monarca) (Labhart e Baumann, 2003) utilizzino il pattern di polarizzazione della luce celeste come stimolo orientante. Tuttavia non è certo che *D. plexippus* impieghi la luce polarizzata per orientarsi durante le sue migrazioni annuali (Reppert et al., 2004; Sauman et al., 2005; Stallekein et al., 2005) anche se le indagini di natura elettrofisiologia hanno fornito dati a favore di questa ipotesi.

Studi preliminari volti ad indagare la sensibilità di *T. saltator* alla luce polarizzata furono condotti da Kerz (1950) e da Pardi e Papi (1953). Esperimenti effettuati con sole schermato e cielo sereno mostrarono che i talitri erano in grado di orientarsi basandosi sulla sola visione del cielo blu, al contrario con cielo totalmente coperto i talitri erano incapaci di orientarsi (Pardi e Papi, 1953). Inoltre in saggi durante i quali veniva modificato il pattern di polarizzazione celeste, mediante l'interposizione di un foglio di polaroid, Pardi e Papi (1953) registrarono un comportamento degli animali sperimentali, saggiati in presenza del polarizzatore, diverso da quello tenuto dagli individui di controllo rilasciati in assenza del filtro. Nei saggi sperimentali i talitri mostravano infatti difficoltà ad orientarsi radialmente e cambiavano frequentemente la loro posizione all'interno del contenitore. Solo in alcuni casi venne registrato uno spostamento significativo degli individui in relazione alla direzione di vibrazione dell'asse del polarizzatore. Con direzione di vibrazione Nord-Sud, ad esempio, gli animali si dirigevano prevalentemente verso Sud e la distribuzione degli individui variava in relazione all'ampiezza della rotazione dell'asse di vibrazione del filtro. Tuttavia è da sottolineare come nell'articolo non viene mai descritto e riportato un chiaro orientamento degli animali verso la direzione attesa, bensì di cumuli di animali che si trovano in settori preferenziali all'interno della ciotola nella quale erano saggiati. La percezione ed eventuale utilizzo del pattern di polarizzazione celeste in *T. saltator* non è mai pertanto stato dimostrato in modo diretto ed esauriente e rimane tutt'ora una questione aperta.

Prove indirette circa la percezione della luce polarizzata nei talitri sono emerse da esperimenti durante i quali veniva filtrata la luce solare con un filtro di vetro (non trasmette la radiazione solare < 310 nm), e da esperimenti condotti al tramonto. I risultati di questi saggi hanno messo in evidenza che *T. saltator* percepisce uno stimolo orientante nelle bande dell'UV- Blu, che potrebbe forse essere rappresentato dalla polarizzazione celeste (Ugolini et al., 1991, 1996, 2004).

Gradiente spettrale e di intensità luminosa

In condizioni di cielo nuvoloso quando il sole non è visibile gli animali possono utilizzare come riferimento orientante, oltre alla già discussa luce polarizzata, altri due "stray-light parameters": il gradiente spettrale e di intensità luminosa del cielo.

La diffusione della radiazione luminosa nell'atmosfera determina infatti oltre alla formazione del pattern di polarizzazione nel cielo, anche un pattern di disposizione spettrale della luce la cui ripartizione varia dipendentemente dalla posizione del sole nel cielo, e quindi si modifica durante il giorno (Waterman, 1981). La diversa composizione spettrale della luce del cielo dipende non solo dai fenomeni di diffusione che avvengono a livello dell'atmosfera, ma anche dalla riflessione della luce da parte della superficie della terra.

Van der Glas (1976) ipotizzò in seguito ad una serie di esperimenti che le api percepissero il pattern di polarizzazione celeste come un pattern di distribuzione spettrale della luce del cielo, le cui caratteristiche fornirebbero agli animali uno stimolo orientante. Tale supposizione basata sull'ipotesi che le api percepiscano il pattern di polarizzazione naturale come stazionario, non modulato, è stata successivamente messa in dubbio da Rossel et al (1984). Dai loro studi è infatti emerso che le api traducono il pattern di distribuzione del vettore 'e' in modulazioni di intensità di UV percepite.

Misurazioni dello spettro della radiazione solare compiute presso la riva del mare hanno messo in evidenza, soprattutto quando l'azimut del sole si trova in corrispondenza della linea di riva, la presenza di una disomogeneità nella calotta celeste (detta fattore ottico locale): l'emicalotta sopra il mare è più ricca di radiazioni con lunghezza d'onda corta (UV, violette e blu), rispetto a quella sopra l'emicalotta di terra (ricca di radiazioni con lunghezza d'onda lunga) (Fiocco et al., 1983). In passato è stato ipotizzato che i talitri fossero in grado di utilizzare il fattore ottico locale come stimolo orientante (Ercolini et al., 1983; Fiocco et al., 1983; Scapini e Ciuti, 1993; Valley, 1965). Tuttavia recenti esperimenti condotti in laboratorio (Ugolini et al., 2001) hanno messo in dubbio che il fattore ottico locale abbia influenza sull'orientamento di *T. saltator*.

Verheijen (1975) evidenziò come la distribuzione anisotropica della radiazione solare potesse essere utilizzata come un fattore orientante in vertebrati ed invertebrati. La distribuzione della radiazione del sole nel cielo crea una differenza tra emicalotta solare ed emicalotta antisolare non soltanto di tipo spettrale, come visto in precedenza, ma anche una differenza nella quantità di intensità luminosa presente tale da formare un vero e proprio gradiente di intensità luminosa che potrebbe essere utilizzato come fattore orientante poiché permetterebbe, agli animali in grado di rilevarlo, di derivare la posizione del sole nel cielo anche quando quest'ultimo non è direttamente e chiaramente visibile (e.g. in presenza di nubi, foschie e con cielo velato).

Sia nelle api (Rossel e Wehner, 1984b) che nelle formiche del deserto (Wehner, 1997) è stato sperimentalmente dimostrato l'utilizzo sia del gradiente spettrale che di intensità luminosa come fattori orientanti. Individui di entrambe le specie con la regione degli occhi (DRA) adibita alla percezione della luce polarizzata oscurata erano infatti in grado di orientarsi correttamente quando veniva permesso loro di vedere ristrette aree di cielo in condizioni di sole non visibile. Tuttavia l'orientamento basato su questi due parametri si è dimostrato in queste

due specie meno accurato rispetto a quello basato sul pattern di polarizzazione celeste .

SPECIE DI STUDIO

I litorali sabbiosi sono ambienti ecotonali e come tali sono soggetti a forti variazioni dei fattori biotici (predazione, risorse trofiche) e abiotici (temperatura, umidità, salinità) (Herrnkind, 1983, Vannini e Chelazzi, 1985). Per questa ragione la maggior parte degli artropodi ripari che vivono in questi ambienti presentano particolari adattamenti atti a compensare l'elevato livello di stress che caratterizza gli ecotoni (Herrnkind, 1983; Vannini e Chelazzi, 1985). Molte specie litorali hanno messo a punto un meccanismo che permette loro di tornare alla zona di elezione della spiaggia ogni volta che se ne allontanano sia attivamente (ricerca di cibo, fuga dai predatori) che passivamente (vento, moto ondoso, piogge intense).

Talitrus saltator (Montagu, 1808) è un crostaceo anfipode semiterrestre comune nei litorali sabbiosi del Mediterraneo e dell'Europa settentrionale all'interno dei quali occupa un habitat che comprende la fascia di sabbia umida sopralitorale della spiaggia. Questo organismo predilige substrati umidi (nei quali scava rifugi sotto la sabbia dove rimane infossato durante il giorno) e una elevata umidità ambientale, mentre presenta una tolleranza al disseccamento molto limitata (Williamson, 1951). E' infatti un tipico abitante della parte del litorale non costantemente battuta dalle onde (Pardi e Papi, 1953), dove gli spruzzi di queste e l'acqua assorbita per capillarità mantengono il tasso di umidità della sabbia costantemente elevato.

I talitri presentano un ritmo nictiemerale (ritmo endogeno sincronizzato con l'alternanza luce-buio nell'arco delle ventiquattro ore) molto marcato: nelle ore diurne gli individui più giovani restano nei rifugi scavati subito sotto la superficie della sabbia prevalentemente nella zona prossima alla linea di riva, mentre gli adulti vivono infossati a maggiore profondità nella parte media e superiore della fascia sopralitorale (Dahl, 1953; Geppetti e Tongiorgi, 1967a, b), è molto raro rinvenire questi animali in attività sulla superficie durante il giorno (Pardi e Papi, 1953). Nel tardo pomeriggio e al tramonto i talitri escono dai loro rifugi temporanei e, specialmente durante la notte, favoriti dalla maggiore umidità atmosferica, possono migrare principalmente a scopo alimentare verso le zone superiori della spiaggia (Pardi e Papi, 1953; Geppetti e Tongiorgi, 1967a, b; Scapini et al., 1992). La migrazione di ritorno si sovrappone a quella di andata e termina quando gli animali sono tornati alla riva (Geppetti e Tongiorgi, 1967a, b).

Durante il periodo di massima attività i talitri possono allontanarsi di oltre 100 m dalla linea di riva, tuttavia la maggior parte, specialmente se giovani, non si sposta per più di 50 m dalla zona di elezione della spiaggia (Geppetti e Tongiorgi, 1967a, b; Papi, 1960; Tongiorgi, 1963; Scapini et al., 1992; Williamson, 1951).

I movimenti all'interno della battigia avvengono secondo direzioni casuali, la prolungata permanenza in acqua, dove il rischio di predazione da parte dei pesci è elevato (Ugolini, 1989), o sulla sabbia asciutta, dove sono soggetti al pericolo di disidratazione (Palluault, 1954; Pardi e Papi, 1953; Williamson, 1951), stimola in questi animali il comportamento di fuga, ovvero il recupero zonale, verso terra o verso mare, seguendo il percorso più breve e rettilineo (asse Y), perpendicolare alla linea di riva (asse X) (DTF: direzione teorica di fuga). Nel far ritorno alla zona di elezione gli animali non necessariamente tornano nel punto preciso da cui sono stati rimossi, ma mantengono una direzione tale da raggiungere, nel minor tempo possibile, un qualsiasi punto della fascia umida che sia ecologicamente equivalente (Pardi e Papi, 1953).

Esperimenti condotti su giovani inesperti nati in laboratorio hanno dimostrato che la direzione teorica di fuga ecologicamente efficace è determinata geneticamente e caratteristica di ogni popolazione (Pardi et al., 1958; Pardi, 1960; Pardi e Scapini, 1979; Ugolini e Macchi, 1988). Tuttavia tale direzione di fuga è modificabile dall'esperienza, infatti gli individui inesperti mostrano una minore correttezza nell'orientamento rispetto ad individui adulti che hanno avuto esperienza della loro spiaggia di origine (Pardi, 1960; Ugolini e Scapini, 1988; Scapini et al., 1988). La maggiore variabilità nell'orientamento di individui giovani inesperti si riduce notevolmente negli adulti grazie alla possibilità di associare le informazioni sull'orientamento dell'asse Y della propria spiaggia con la tendenza direzionale innata (Ugolini et al., 1988). La plasticità nella determinazione della direzione di fuga ha un valore ecologico importante, consente infatti a questi animali l'utilizzazione di sistemi bussolari di orientamento, nonostante le variazioni di orientamento delle coste nello spazio e nel tempo (Ugolini e Scapini, 1988). Infatti la capacità di apprendimento di nuove direzioni fuga nei talitri ha reso loro possibile la colonizzazione delle rive di stagni retrodunali e di fiumi (Ugolini e Macchi, 1988; Ugolini et al., 1991).

I fattori orientanti utilizzati da *T. saltator*

I fattori che *T. saltator* utilizza durante il ritorno verso la zona di elezione possono essere sia a carattere universale (come il sole) che locale (Ercolini e Scapini, 1974; Hartwick, 1976; Ugolini et al., 1986; Ugolini e Cannicci, 1991).

Gli stimoli orientanti utilizzati da *T. saltator*, elencati da Pardi ed Ercolini (1986) sono costituiti da: sole, luna, luce polarizzata, campo magnetico terrestre, pendenza del substrato, visione del paesaggio e fattori locali del cielo (Ercolini et al., 1983; Fiocco et al., 1983; Mezzetti e Scapini, 1995; Pardi e Papi, 1953; Ugolini et al., 1986). I fattori orientanti di natura visiva sembrano essere i più importanti, mentre gli altri forniscono informazioni coadiuvanti o alternative in caso di visibilità limitata (Pardi ed Ercolini, 1986). E' stato dimostrato (Hartwick, 1976; Pardi e Scapini, 1979; Scapini e Ugolini, 1981;

Ugolini et al., 1984, 1986; Williamson, 1951, 1954;) che la visione del paesaggio ha un importante effetto sull'orientamento dei talitri (Ugolini et al., 1988) specialmente quando sono gli animali si orientano verso terra (Pardi e Scapini, 1979).

Recentemente è stato inoltre evidenziato come un paesaggio a colori (rispettivamente blu e verde a simulare il mare e la macchia mediterranea) rappresenti un valido riferimento orientante per questa specie (Ugolini et al. 2006), tale risultato ha messo in luce l'importanza ecologica di queste due lunghezze d'onda nel meccanismo di recupero zonale di questi organismi.

La visione in T. saltator

I talitri possiedono occhi composti, sessili, latero-dorsali del tipo "gammaride" (Hallberg et al., 1980), più primitivi rispetto a quelli delle api. Ogni occhio è costituito da circa 270 ommatidi (Gallien e David, 1936); trattandosi di occhi per apposizione, ad intensità luminose elevate ogni ommatidio si presenta otticamente isolato dagli ommatidi adiacenti, mediante la presenza di pigmenti schermanti che impediscono, alla luce entrata in un ommatidio, di diffondersi negli ommatidi adiacenti (Land, 1981; Schmitz, 1992). Ciascun ommatidio è composto di una parte diottrica e una fotorecettore; la parte diottrica è formata dalla cuticola esterna, non sfaccettata, che è parte integrante della cuticola che riveste tutto il corpo, e del cono cristallino; la parte fotorecettore è costituita da rhabdoma formato dalle espansioni microvillari (rhabdomeri) di cinque cellule retiniche. Quattro cellule retiniche sono allungate e disposte in modo che i microvilli delle cellule 1 e 3 siano ortogonali a quelli delle cellule 2 e 4; la quinta cellula è invece molto corta e presenta microvilli orientati a 45° rispetto alle cellule 1 e 4; questa partecipa molto poco alla formazione del rhabdoma (Ercolini, 1964).

La sensibilità spettrale di *T. saltator* non è stata oggetto di numerose indagini. In generale *T. saltator* presenta fototassia positiva se sottoposto a condizioni sperimentali in cui è chiamato a scegliere tra una fonte luminosa a luce monocromatica ed il buio (Ercolini e Scapini, 1976). Gli stessi esperimenti hanno rilevato anche una diminuzione della fototassia positiva nei confronti di lunghezze d'onda nella banda del rosso e dell'arancio, per la radiazione visibile, e dell'infrarosso, permettendo quindi di escludere un loro ruolo nell'orientamento visivo; infatti animali illuminati da luce arancio-rossa ed infrarossa si disperdono in maniera casuale. Tipologie sperimentali diverse hanno inoltre evidenziato che animali collocati tra due luci monocromatiche di lunghezza d'onda differente, ma con la stessa intensità, tendono a preferire la luce a lunghezza d'onda minore (Ercolini e Scapini, 1976). Nell'ambito di tali sperimentazioni non venne considerata la capacità di risposta fototattica alla banda dell'UV, più volte ipotizzata in questa specie ma mai provata in modo diretto.

Per indagare la sensibilità spettrale degli anfipodi talitridi e verificare se questi possiedono o meno un sistema visivo dotato delle caratteristiche richieste

per la percezione dei colori, sono state inoltre effettuate indagini retinografiche che hanno fornito preliminari informazioni sulla sensibilità dei recettori (Mezzetti e Scapini, 1995, Ugolini et al., 1996).

In un elettroretinogramma è possibile registrare il numero di fotoni che entrano nell'occhio alle diverse lunghezze d'onda dello spettro; la sensibilità è il reciproco di tale numero.

Le misure elettroretinografiche condotte su *T. saltator* hanno evidenziato la presenza di due picchi di sensibilità spettrale: uno nel blu ($\lambda = 450$ nm) e uno nel verde ($\lambda = 560$ nm) (Mezzetti e Scapini, 1995, Ugolini et al., 1996). Indagini preliminari hanno inoltre messo in evidenza la possibile presenza di un ulteriore picco a 380 nm (Laffort, 1992).

FINALITÀ DELLA RICERCA

Dagli argomenti da me riportati emerge come, benché *T. saltator* sia utilizzato come modello biologico per gli studi di orientamento sin dagli anni '50, rimangono ancora alcune questioni aperte soprattutto circa l'utilizzo ed il riconoscimento dei fattori orientanti astronomici e celesti in questa specie. Inoltre la relazione tra i fattori orientanti utilizzati da questi organismi e la capacità visiva che i talitri possiedono non è mai stata approfondita. Questo tipo di approccio sperimentale in questo campo si è peraltro molto diffuso negli ultimi decenni.

Partendo da queste considerazioni questa tesi si propone i seguenti obiettivi:

- Chiarire la possibile percezione ed eventuale utilizzo del pattern di polarizzazione celeste in questa specie, sia effettuando saggi di tipo comportamentale che valutando la presenza di strutture in grado di percepire ed analizzare la luce polarizzata.
- Indagare circa il possibile utilizzo dei pattern di distribuzione spettrale e di intensità luminosa
- Verificare la sensibilità spettrale di *T. saltator* alle diverse lunghezze d'onda ed il particolare alla luce UV, sia con un approccio di tipo comportamentale, che morfologico ed elettrofisiologico.
- Verificare se la presenza di una regionalizzazione dei pigmenti visivi in questa specie.
- Chiarire i parametri sui quali è basata l'identificazione dei fattori orientanti astronomici.

BIBLIOGRAFIA

- Able K. P.** 1980. Mechanisms of orientation, navigation, homing. In: *Animal migration, orientation, and navigation*. (Ed. by S. A. Gauntreux Jr), pp. 284-364. Academic Press New York London Toronto Sydney San Francisco.
- Brines M. L. & Gould J. L.** 1979. Bees have rules. *Science*, **206**, 571-573.
- Brines M. L. & Gould J. L.** 1982. Skylight polarization patterns and animals orientation. *J. Exp. Biol.* **96**, 69-91.
- Brunner D. & Labhart L.** 1987. Behavioural evidence for polarization vision in crickets. *Physiol. Entomol.*, **12**, 1-10.
- Dahl E.** 1953. Some aspects of ecology and zonation of the fauna on sandy beach *Oikos*, **4**, 1-27
- Duelli P. & Wehner R.** 1973. The spectral sensitivity of polarized light orientation in *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera). *J. Comp. Physiol.*, **86**, 37-53.
- Craig P.C.** 1971. An analysis of the concept of lunar orientation in *Orchestoidea Corniculata* (Amphipoda). *Anim. Behav.* **19**, 368-374.
- Edrich N. & Von Helversen O.** 1976. Polarized light orientation of the honeybee: the minimum visual angle. *J. Comp. Physiol. A*, **134**, 151-157.
- Eguchi E.** 1999. Polarized light vision and rhabdom. In: *Atlas of Arthropod Sensory Receptors: Dynamic Morphology in Relation to Function* (Ed. by Eguchi E. & Tominaga Y.), pp. 33-46. Springer-Verlag New York, LLC.
- Enright J.T.** 1972. When the beachhopper looks at the moon: the moon-compass hypothesis. In: *Animal orientation and migration*. (Ed. by S. Galler et al.), pp. 523-555. Washington, D.C. NASA SP-262 Government Printing Office.
- Ercolini A.** 1960. Sul cielo normale di attività di alcuni Talitridae litorali. *Boll. Ist. Mus. Zool. Univ. Torino*, **6** (7), 1-8
- Ercolini A.** 1963. Ricerche sull'orientamento solare degli anfipodi. La variazione dell'orientamento in cattività. *Arch. Zool. Ital.*, **48**, 147-179.
- Ercolini A. & Scapini F.** 1974. Sun compass and shore slope in the orientation of littoral amphipods (*Talitrus saltator* Montagu). *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, **8**, 85-115.
- Ercolini A. & Scapini F.** 1976. Sensitivity and response to light in the laboratory of the littoral Amphipods *Talitrus saltator* Montagu. *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, **10**, pp: 293-309.
- Ercolini A., Pardi L. & Scapini F.** 1983. An optical directional factor in the sky might improve the direction finding of sandhoppers on the seashore. *Monit. Zool. Ital. (N.S.)*, **17**, 313-327.
- Fiocco G., Guerrini A. & Pardi L.** 1983. Spectral differences in the sky radiance over land and over sea and orientation of the littoral amphipod *Talitrus saltator* Montagu. *Atti Accad. Naz. Lincei*, **74**, 25-33.

- Gallien L. & David R.** 1936. Anomalies, regression et perte de l'oeil chez *Talitrus saltator* Montagu. *Bull. Biol. France et Belgique*, **70**, 184-196.
- Geppetti L. & Tongiorgi P.** 1967a. Ricerche ecologica sugli Artropodi di una spiaggia sabbiosa del litorale tirrenico. II Le migrazioni di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea – Amphipoda). *Redia*, **50**, 309-336.
- Geppetti L. & Tongiorgi P.** 1967b. Nocturnal migrations of *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, **1**, 37-40.
- Hallberg E., Nilsson H. L. & Elofsson R.** 1980. Classification of Amphipod compound eyes – the fine structure of the ommatidial units (Crustacea – Amphipoda). *Zoomorphologie*, **94**, 279-306.
- Hartwick R. F.** 1976. Beach orientation in talitrid amphipods: capacities and strategies. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **1**, 447-58.
- Herrnkind, W.F.** 1972. Orientation in shore-living arthropods, especially the sand fiddler crab, In: *Behavior of marine animals: current perspectives in research: 1. Invertebrates* (Ed. by Winn, H.E. & Olla, B.L.) pp. 1-57. The University of Chicago Press.
- Herrnkind W. F.** 1983. Movement patterns and orientation. In: *The biology of Crustacea. Behaviour and ecology*. (Ed. By F. J. Venberg & W. B. Venberg) pp. 41-105. Academic press, New York.
- Homberg U.** 2004. In search of the sky compass in the insects in the brain *Naturwissenschaften*, **91**, 199-208.
- Horváth G. & Varijú D.** 2004. Polarization light in animal vision. Polarization patterns in nature. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Jander R.** 1957. Die optische Richtungsorientierung der Roten Waldameise (Formica Rueda L.). *J. Comp. Physiol. A*, **40**, 162-238.
- Kerz M.** 1950. Wahrnehmung polarisierten Lichtes durch Eupagurus. *Experientia*, **6**, 427.
- Labhart T** 1986. The electrophysiology of photoreceptors in different eye regions of the desert ant, *Cataglyphis bicolor*. *J. Comp. Physiol. A*, **158**, 1-7.
- Labhart T & Baumann F.** 2003. Evidence for a polarization compass in monarch butterflies. *Proc. Neurobiol. Congr. Göttingen.*, **29**, 545.
- Labhart T, Hodel B. & Valenzuela I.** 1984. The physiology of the crickets compound-eye with particular reference to the anatomically specialized dorsal rim area. *J. Comp. Physiol. A*, **155**, 289-296.
- Laffort B.** 1992. Orientation spaziale et lumière polarisée chez *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda). These du doctorat de l'Université Paul Sabatier. Sciences du comportement et neurosciences cognitives.
- Land M. F.** 1981. Optics and Vision in Invertebrate. In: *Handbook of sensory physiology. Vision in invertebrates*. (Ed. by H. Autrum.) pp. 471-594. Vol. **VII/6B**, Springer-Verlag.
- Lindauer M.** 1954. Dahertanze im Bienenstock und ihre Beziehung zur Sonnenbahn. *Naturwissenschaften*, **41**, 506-507.

- Lindauer M.** 1957. Sonnenorientierung der Bienen unter der Äquatorsonne und zur Nachtzeit. *Naturwissenschaften*, **44**, 1-6.
- Mappes M. & Homberg U.** 2004. Behavioural analysis of polarization vision in tethered flying locust. *J. Comp. Physiol. A*, **190**, 61-68.
- Menzel R.** 1974. Polarized light sensitivity in Arthropods. In: *Light as an ecological factor*. (Ed. by G. C. Evans, R. Bainbridge & O. Rackham) pp. 289-303. Blackwell Science Publication, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- Mezzetti M. C. & Scapini F.** 1995. Aspects of spectral sensitivity in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea - Amphipoda). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, **26**, 35-45.
- Pallaut M.** 1954. Notes acologiques sur le *Talitrus saltator*. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **91**, 105-129.
- Papi F.** 1955. Experiments on the sense of time in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda). *Experientia*, **11**, 201.
- Papi F.** 1960. Orientation by night: the moon. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **25**, 475-480.
- Papi F. e Pardi L.** 1954. La Luna come fattore di orientamento degli animali. *Boll. Ist. Mus. Zool. Univ. Torino*.
- Papi F. & Pardi L.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). II. Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte. L'orientamento diurno di altre popolazioni. *Z. Vergl. Physiol.*, **35**, 490-518.
- Papi F. & Pardi L.** 1959. Nuovi reperti sull'orientamento lunare di *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Z. Vergl. Physiol.*, **41**, 583-596.
- Papi F. e Pardi L.** 1963. On the lunar orientation of sandhoppers (Amphipoda, Talitridae). *Biol. Bull.* **124**, 97-105.
- Pardi L.** 1954. Esperienze sull'orientamento di *Talitrus Saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda): l'orientamento al Sole degli individui a ritmo nicti-emerale invertito, durante la "loro notte". *Boll. Ist. Mus. Zool. Univ. Torino*.
- Pardi L.** 1957. L'orientamento astronomico degli animali: risultati e problemi attuali. *Boll. Zool.*, **24**, 473-523.
- Pardi L.** 1958. Esperienze sull'orientamento solare di *Phaleria provincialis* Fauv. (Coleopt.): Il comportamento a luce artificiale durante l'intero ciclo di 24 ore. *Atti Accad. Sci. Torino*.
- Pardi L.** 1960. Innate components in the solar orientation of littoral amphipods. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **25**, 395-401.
- Pardi L. & Ercolini A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrids crustaceans. *Boll. Zool.*, **53**, 139-160.
- Pardi L. & Papi F.** 1952. Die sonne als compass bei *Talitrus saltator*. *Naturwissenschaften*, **39**, 262-263.

- Pardi L. & Papi, F.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea: Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico. . *Z. Vergl. Physiol.*, **35**, 459-489.
- Pardi L., Ercolini A., Marchionni V. & Nicola C.** 1958. Ricerche sull'orientamento degli antipodi del litorale: il comportamento degli individui allevati in laboratorio sin dall'abbandono del marsupio. *Atti Accad. Sci. Torino*, **92**, 1-8.
- Pardi L. & Grassi M.** 1955. Experimental modifications of direction-finding In *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia deshayesei* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda). *Experientia*, **11**, 202-210.
- Pardi L. & Papi. F.** 1963. On the lunar orientation of sandhoppers (Amphipoda Talitridae). *Biol. Bull. Mar. Lab. Woods Hole*, **124**, 97-105.
- Papi F. and Tongiorgi, P.** 1963. Innate and learned components in the astronomical orientation of wolf spiders. *Ergeb. Biol.* **26**, 259-280.
- Pardi L. & Scapini F.** 1979. Solar orientation and landscape visibility in *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Monit. Zool. Ital. (N.S.)*, **13**, 210-211.
- Reppert S. M., Zhu H. & White R. H.** 2004. Polarized light helps monarch butterflies navigate. *Curr. Biol.*, **14**, 155-158.
- Rossel S. & Wehner R.** 1982. The bees map of the E – vector pattern in the sky. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 605-613.
- Rossel S. & Wehner R.** 1984a. How bees analyse the polarization patterns in the sky. *J. Comp. Physiol. A*, **154**, 605-613.
- Rossel S. & Wehner R.** 1984a. Celestial orientation in bees: the use of spectral cues. *J. Comp. Physiol. A*, **155**, 607-615.
- Rossel S. & Wehner R.** 1986. Polarization vision in bees. *Nature*, **325**, 128-131.
- Rossel S., Wehner R. & Lindauer M.** 1978. E-vector orientation in bees. *J. Comp. Physiol.*, **125**, 1-12.
- Santschi F.** 1911. Observation et remarques critiques sur le mecanisme de l'orientation chez le formiques. *Rev. Suisse. Zool.*, **9**, 303-338.
- Sauman I., Briscoe A. D., Zhu H. S., Shi D. D., Foy O., Stallaiken J., Yuan Q., Casselman A. & Reppert S. M.** 2005. Connecting the navigational clock to sun compass input in monarch butterfly brain. *Neuron.*, **46**, 457-467
- Scapini F. & Ciuti M.** 1993. Effect of experience on the reaction of sandhoppers to wet and dry sustrates and to monochromatic lights. *Eth. Ecol. & Evol.*, **5**, 87-96.
- Scapini F. & Ugolini A.** 1981. Influence of landscape on the orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, **15**, 324-325.
- Scapini F., Chelazzi L., Colombini I. & Fallaci M.** 1992. Surface activity zonation and migrations of *Talitrus saltator* on a aMediterranean beach. *Mar. Biol.*, **112**, 573-581.

- Scapini F., Ercolini A. & Boccacci R.** (1988) "Laboratory experiments on geotaxis, phototaxis and anemotaxis in two species of littoral Amphipods. *Monit. Zool. Ital. (N. S.)*, **22**, 89-103.
- Schmitz E. H.** 1992. Amphipoda. In: *Microscopic anatomy of invertebrates* (Ed. by F. W. Harrison & A. G. Humes), pp. 443-528. Wiley – Liss press.
- Schone H.** 1963. Menotaktische Orientierung nach polarisiertem und unpolarisiertem Licht bei der Mangrovekrebbe *Goniopsis*. *Z. vergl. Physiol.*, **46**, 496-514.
- Stallaiken J., Mukhida M., Labhart T., Whener R., Frost B. & Mouritsen H.** 2005. Do monarch butterflies use polarized skylight for migratory orientation?. *J. Exp. Biol.*, **208**, 2399-2408.
- Tongiorgi P.** 1959. Effects of the reversal of the rhythm of nycthemeral illumination on astronomical orientation and diurnal activity in *Arctosa variana* C. L. Koch (Araneeae-Lycosidae). *Arch. Ital. Biol.*, **97**, 251-265.
- Tongiorgi P.** 1963. Ricerche ecologiche sugli Artropodi di una spiaggia sabbiosa del litorale tirrenico. I. Caratteristiche generali dell'ambiente e metodi di studio. *Redia*, **48**, 165-177
- Tovee M. J.** 1995. Ultra - violet photoreceptors in the animal kingdom: their distribution and function" In: *Trends in Ecology and Evolution*, pp. 455-460. Vol. **10**, Elsevier Science.
- Ugolini A.** 1989. Orientation in the water and antipredatory behaviour in sandhoppers. *Mar. Behav. Physiol.*, **14**, 223-230.
- Ugolini A. & Cannicci S.** 1991. Solar orientation in british sandhoppers. *Mar. Behav. Physiol.*, **19** (2), 149-157.
- Ugolini A. & Castellini, C.** 2004. Sun compass orientation of *Tylos europaeus* (Crustacea, Isopoda) under artificial light. *Ethology*, **110**, 581-590.
- Ugolini A. & Macchi T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **121**, 79-87.
- Ugolini A. & Scapini F.** 1988. Orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) living on dynamic sandy shores. *J. Comp. Physiol.*, **162**, 453-462.
- Ugolini A., Castellini C. & Tiribilli B.** 2004. The orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* during a partial solar eclipse. *J. Comp. Physiol. A*, **190**, 855-859.
- Ugolini A., Fantini T. & Innocenti R.** 2003 Orientation at night: an innate moon compass in sandhoppers (Amphipoda : Talitridae). *Proc. R. Soc. B* **270**, 279-281.
- Ugolini A., Felicioni S. & Macchi T.** 1991. Orientation in the water and learning in *Talitrus saltator* Montagu. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **151**, 113-119.

- Ugolini A., Meucci L., Tiribilli B. & Lindström M.** 2001. The local optical factor as an orientation cue for the sandhopper *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda, Talitridae). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, **35**, 27-36.
- Ugolini A., Melis C. & Innocenti R.** 1999a. Moon orientation in adult and young sandhoppers. *F. Comp. Physiol. A*, **184**, 9-12.
- Ugolini A., Melis C., Innocenti R., Tiribilli B. & Castellini, C.** 1999b. Moon and sun compass in sandhoppers rely on two separate chronometric mechanisms. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **266**, 749-752
- Ugolini A., Morabito F. & Castellini C.** 1997. Spectral filtering and celestial orientation in the semi-terrestrial isopod *Tylos europaeus*. *Ethol. Ecol. Evol.*, **9**, 261-268.
- Ugolini A., Scapini F. Beugnon G. & Pardi L.** 1988. Learning in zonal orientation of sandhoppers. In: *Behavioural adaptation to intertidal life* (Ed. by G. Chelazzi, M. Vannini) pp. 115-118. NATO ASI Series Vol. **151**. Plenum Press, London-New York.
- Ugolini A., Scapini F. & Pardi L.** 1986. Interaction between solar orientation and vision of landscape in *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea-Amphipoda). *Mar. Biol.*, **90**, 449-460.
- Ugolini A., Somigli S., & Mercatelli L.** 2006. Green land and blu sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhoppers *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *J. Exp. Biol.*, **209**, 2509-2514.
- Ugolini A., Tiribilli B., Boddi V.** 2002. The sun compass of the sandhopper *Talitrus Saltator*: the speed of the chronometric mechanism depends on the hours of light. *J. Exp. Biol.*, **205**, 3225-3230.
- Ugolini A., Tiribilli B. & Castellini C.** 1998. Artificial light and sun compass orientation in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda). *J. Comp. Physiol. A*, **182**, 43-50.
- Ugolini A., Vignali B., Castellini C. & Lindström M.** 1996. Zonal orientation and spectral filtering in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **76**, 377-389.
- Valley S. L.** 1965. Handbook of geophysics and space environments. Bedford, Massachussets: Air Force Candbridge Research Laboratories.
- Van Der Glas H. W.** 1976. Polarization induced colours patterns a model of the perception of the polarized skylight by insects. *Netherlands J. Zool.*, **26**, 383-413.
- Vannini M. & Chelazzi G.** 1985. Adattamenti comportamentali alla vita intertidale tropicale. *Oebalia (N. S.)*, **11**, 23-37.
- Verheijen F.J.** 1978. Orientation based on directivity, a directional parameter of the animal's radiant environment. In: *Animal Migration, Navigation, and Homing* (Ed. by K. Schmidt-Koenig & W.T. Keeton), pp. 447-458. Springer, Berlin.
- von Frisch K.** 1949. Die polarisation des himmelslichtes als orientierender faktor bei den tanzen der bienen. *Experientia*, **6**, 210-221.

- von Frisch K.** 1950. Die sonne als kompass in leben der bienen. *Experientia*, **5**, 142-148.
- von Frisch K.** 1967. The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Waterman T. H.** 1981. Polarization sensitivity. In: *Handbook of sensory physiology. Vision in invertebrates*. (Ed. by H. Autrum) pp. 281-469. Vol. **VII/6B**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Wehner R.** 1972 Dorsoventral asymmetry in the visual field of the bee, *Apis mellifica*. *J. Comp. Physiol. A.* **77**, 256-277.
- Wehner R.** 1976. L'orientamento degli insetti mediante luce polarizzata. *Le Scienze*, **99**, 134-144.
- Wehner R.** 1989. Neurobiology of polarization vision. *Elsevier Sc. Publ. Ltd (U. K.)*, **21**, 353-359.
- Wehner R.** 1992. Arthropods. In: *Animal homing* (Ed. by F. Papi) pp. 45-144. Chapman & Hall London, New York, Tokio, Melbourne, Madras.
- Wehner R.** 1997 The ant's celestial compass system: spectral and polarization channels. In: *Orientation and Communication in Arthropods* (Ed. by M. Lehrer) pp. 145-187. BirkhauserVerlag Basel/Switzerland.
- Wehner R. & Strasser. S.** 1985. The pol area of the honeybee's eye: Behavioural evidence. *Physiol. Entomol.*, **10**, 337-349.
- Williamson D. I.** 1951. Studies on the biology of the Talitridae (Crustacea, Amphipoda): visual orientation in *Talitrus saltator*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **30**, 91-99.
- Williamson D. I.** 1954. Landward and seaward movements of the sand-hopper *Talitrus saltator*. *Adv. Sci.*, **11**, 71-73.
- Zolotov V. & Frantsevich L.** 1973. Orientation of bees by the polarized light of a limited area of the sky. *J. Comp. Physiol. A.*, **85**, 25-36.

CAPITOLO 2

ULTRAVIOLET-BLUE RANGE PHOTORESPONSES USING THE COMPOUND EYE OF THE SANDHOPPER, *TALITRUS SALTATOR* (CRUSTACEA, AMPHIPODA)

A. Ugolini¹, G. Borgioli¹, G. Galanti¹, L. Mercatelli², T. Hariyama³

1. Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze, Via Romana 17, 50143 Firenze, Italy.
2. Istituto Nazionale di Ottica Applicata – CNR, Largo E. Fermi 6, 50143 Firenze, Italy
3. Department of Biology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1, Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

Accepted with revision for publication to Biological Bulletin

Nota: Gli esperimenti descritti in questo capitolo sono stati effettuati in collaborazione con la Dott.ssa Martina Cerboni.

ABSTRACT

The semi-terrestrial sandhopper, *Talitrus saltator*, orients along the sea–land axis of the beach using astronomical visual cues. Previous spectral filtering experiments suggested that it perceives directional information from wavelengths in the ultraviolet (UV)-blue range. Binary choice experiments between dark and UV (380 nm) light carried out on dark-adapted *T. saltator* showed photopositive movement to UV. Morphologically, each ommatidium consists of five retinula cells, four large ones and one small. In electroretinogram experiments, sensitivity of the dark-adapted eye is dominated by a receptor maximally sensitive around 390–450 nm and secondarily sensitive around 500–550 nm. Selective light adaptation experiments using 580 nm light adaptation experiments showed the apparent sensitivity decreasing around the secondary sensitive range disclosing the existence of UV-blue photoreceptor cells. Here we confirmed the existence of UV-blue detection, and those green and UV-blue visual pigments might be located in those different sized retinula cells.

INTRODUCTION

Sandhoppers are ideal biological models to study some aspects of spatial orientation in animals. Their small dimensions, ease of rearing in the laboratory, the simplicity of the device normally used in astronomical orientation experiments, and knowledge of the autoecological problems of zonal recovery (the necessity of a quick return to their belt of sand along the sea-shore) allowed us to assess the presence of several orientation mechanisms, predominantly based on visual cues (see Pardi and Ercolini, 1986, Ugolini, 2003 for revision). Indeed, their use of the sun and the moon to orient along the sea – land axis of the beach has been known for many years (Pardi and Papi, 1952, Pardi and Papi, 1953, Papi and Pardi, 1953, Papi, 1960, see also Ugolini *et al.*, 1999, Ugolini, 2001). Sandhoppers can also use some orienting factors they can perceive from the blue sky when the sun is not visible (Papi and Pardi, 1952, Pardi and Papi, 1953, Ugolini *et al.*, 1993, 1996, 2004). In particular, spectral filtering experiments during orientation under blue sky showed that *Talitrus saltator* (Montagu) perceives important directional information for zonal recovery from wavelengths in the ultraviolet (UV) – blue range (Ugolini *et al.*, 1993, 1996). Additionally, they can also use landscape vision (Ugolini *et al.*, 1986, 2006), and it has recently been demonstrated that “blue” and “green” wavelengths are ecologically significant for *T. saltator*, since an artificial coloured landscape influences both the direction of orientation and the dispersion of individuals around their mean direction (Ugolini *et al.*, 2006).

Despite clear reports on the importance of vision in the orientation of sandhoppers, investigations on their visual capacity are not numerous and often have a preliminary character. Ercolini and Scapini (1976) by behavioural tests assessed only a general preference for short wavelengths of visible spectrum in

T. saltator, without performing any test of visual perception in the UV range. Electrophysiological investigations in the past indicated sensitivity only in the blue range (450 nm), and suggested possibility in the green (Mezzetti and Scapini, 1995, Ugolini *et al.*, 1996). UV vision is widespread in vertebrates and in invertebrate where it is used for communication, in foraging for food, in navigation for the suitable area and in mate selection (Johnson *et al.*, 2002, Hunt *et al.*, 2001). Therefore, studies on spatial orientation must take into account the perception of spectral cues and spectral sensitivities in the UV-blue region too.

The aim of this paper is to investigate the existence of UV-blue photoresponses in *T. saltator* eyes, which has been controversial for a long time. We carried out two types of experiments: behaviour – based response (binary choice) and electrophysiological tests (electroretinogram). In addition to those experiments, we also clarified the eye structure of *T. saltator*.

MATERIALS AND METHODS

We used adult individuals of *Talitrus saltator* collected in spring – summer 2006, 2007 on a sandy beach in southern Tuscany (42° 46'N, 11° 6'E, Albegna, Grosseto, Italy). After capture, the individuals were transferred to the laboratory in Plexiglas boxes containing wet sand. They were fed weekly with dry fish food and blotting paper. The animals were subjected to an artificial light: dark cycle corresponding in phase and duration to natural dawn and dusk.

Behavioural test

To assess whether sandhoppers were able to respond to UV light behavioural trials were performed in dark conditions. The tests were carried out using the experimental apparatus showed in Fig. 1.

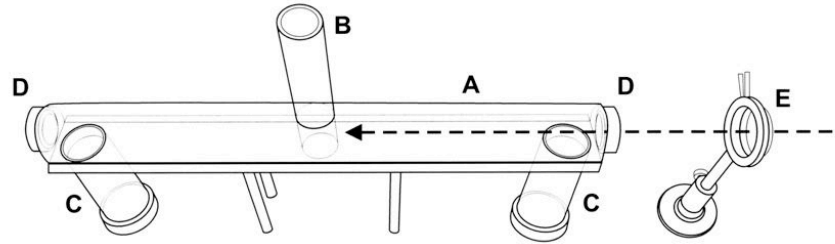


Figure 1 Experimental device for binary choice experiments. A: Plexiglas tube arena, B: Plexiglas cylinder to keep the specimens in dry condition, C: traps for the specimens, D: ultra-violet light emitting end of controlled light intensity, E: lens projecting parallel light into the arena

It consists of a Plexiglas tube (60 cm long, diameter 6.3 cm) horizontally placed. At one of the two extremities, an interference filter (360 nm Andover Corporation, USA) was placed in a black cap: the only light transmitted in the tube was the light transmitted by the filters, and the other side was protected to prevent entry of light. As an emitting source we used a Xenon lamp (lamp: XBO150W Osram, Germany), the beam was collimated by a lens. To exclude any possible external influence on the sandhoppers' response, the light was projected onto the animals from each side of the Plexiglas tube, alternately in each trial. We also used a neutral density filter to equalize the light intensity of each beam. A power meter (receptor head PD300UV, Nova Display, Ophir Optonics) centred in the middle of the Plexiglas tube measured light intensity. The number of quanta used in this experiment was 1.8×10^{13} quanta/cm²/s. For each release, 10 – 12 specimens were corralled in the container used to keep them in the laboratory and placed at the middle of the Plexiglas tube with a help of a transparent narrow Plexiglas cylinder vertically inserted into the hole. Sandhoppers were thus prevented from escaping in any

direction and were kept in dry conditions, in the dark. After 20 minutes, the UV beam was allowed to penetrate the tube from one end, and sandhoppers were released by the removal of the vertical cylinder. The numbers of specimens that fell into pitfall traps located at the two ends of the corridor were counted 2 minutes after release. Data was statistically analysed by *G* test ($P < 0.05$ at least; Zar, 1984).

Electrophysiological recordings

The whole animal was used for the electrophysiological experiments. The head of the animal was glued on a stage and fixed using melted bee wax and resin (1:1). The rest of the body was covered by wet paper with filtered seawater, and covered again by dental wax to hold the body and to prevent its dehydration. The reference electrode, chlorided silver wire, was placed into the head and the small wound was covered with bees wax. For electroretinogram (ERG) recordings, a glass electrode filled by seawater was introduced at the surface of crystalline cone layer just below the cornea.

The end of the light guide was placed near the compound eye. Responses were amplified with a high-impedance pre-amplifier (Nihon Kodens MZ 8201) and a high-gain amplifier (Nihon Kodens AVH-10). The magnitude of the responses (peak amplitude) was monitored on an oscilloscope (Nihon Kodens VC10). The permanent recordings were made with a paper recorder (Graphtec Linearecorder FWR 3701).

A two-channel optical system was utilized using a 500 W Xenon arc lamp (Ushio Inc., Type UXL-500D-O, Japan) regulated by a power supply (Sanzo XD-25, Japan); one beam was for testing and the other for chromatic adaptation (Fig. 2). At each channel, quartz lenses produced a parallel beam of light, which passed through a heat absorption filter (Toshiba IRA-25S), and one of a set of 16 narrow band interference colour filters (Vacuum Optics Corp., Japan) for the testing light and two different (380 nm or 580 nm) narrow band interference filters for the adapting light. The half bandwidths of all interference filters used both in behavioural tests and in electrophysiological recordings were ca. 15 nm. The light intensities of the testing and adapting lights were measured with a silicon photodiode (S876-1010BQ, Hamamatsu Photonics K.K.) calibrated by Hamamatsu Photonics K.K. using a photo-electron bulb and each monochromatic light was adjusted with the aid of neutral density filters so that each of them contained an equal number of photons. At all wavelengths the maximum intensity available at the surface of the eye was 1.8×10^{14} quanta/cm²/s for testing, and 6.0×10^{14} quanta/cm²/s for chromatic adaptation. The light intensity of testing light was altered with quartz neutral density filters (Vacuum Optics Corp., Japan) to get intensity –response curves. The test and chromatic adaptation beams were interrupted by shutters (Uniblitz photographic and Copal) controlled for the duration of the test flash and adaptation times by a stimulator (Nihon Kodens SEN-7103).

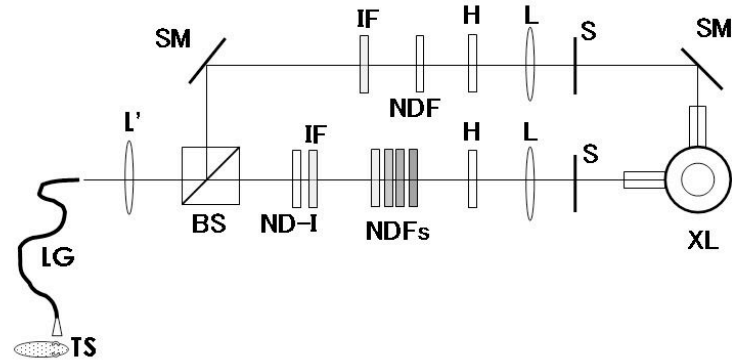


Figure 2 Light stimulating and adapting equipment for selective light adaptation experiment. XL: xenon lamp, SM: surface mirror, S: electrically controlled shutter, L: lens that produces parallel light, H: heat absorbing filter, NDFs: neutral density filters, IF: interference filters, NDF: neutral density filter, ND-I: neutral density filter which adjusts light with equal number of photons, BS: beam splitter, L': lens that focuses the light onto the end of the quartz light guide, LG: quartz light guide, TS: specimen

Morphological observations

The compound eye of *T. saltator* is sessile and was easily broken by the pressure from scissors or a scalpel when we tried to remove the eye itself from the body. Therefore, we first removed the head from the body using a small piece of razor blade dipped in a primary fixative solution (2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium-cacodylate buffer, pH 7.4). The separated heads were immersed in primary fixative solution and placed in a refrigerator (4°C) for 2 hours, and rinsed in a cacodylate buffer solution twice. The eyes enucleated from the head under the microscope were post-fixed for 2h with 1% OsO₄ in the same buffer. After being rinsed, the fixed eyes were dehydrated through a graded series of ethanol solutions, transferred to propylene oxide and embedded in Epon 812. For transmission electron microscopy, sections were cut with a

Porter-Blum MT-2B microtome and picked up with 100-mesh copper grids. They were double-stained with 1% uranyl acetate and 0.1% lead citrate solution for 20 min and 30 min, respectively. Observations were performed using a JEOL JEM1220 transmission electron microscope. For scanning electron microscopy, whole animals were prefixed overnight in 2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde, buffered with 0.1M sodium cacodylate buffer adjusted to pH 7.4. The specimens were then rinsed several times in 0.1M sodium cacodylate buffer solution, postfixed for two hours in 1% OsO₄ in phosphate buffered saline (0.13M, pH 7.4) at room temperature, dehydrated through a graded series of ethanol solutions and rinsed in 100 % *t*-butyl alcohol three times at 37°C. Next, the specimens were frozen at -20 °C and freeze dried for several hours at 2 °C. The dried specimens were then coated with OsO₄ (Meiwa, Plasma multicoater PMC-5000) and observed with a scanning electron microscope (Hitachi, S-4800).

RESULTS

Behavioural tests and electrophysiological recordings

The animals placed in the Plexiglas tube for 30 min in dark condition moved around very actively at the centre of the Plexiglas tube where they were caged (Fig.1). When the sandhoppers were irradiated with UV light they displayed apparent phototaxis to the light. Indeed about 70 % of the animals moved toward the UV light and ca. 30% to the dark; no specimens remained in the centre of the Plexiglas tube (Fig. 3). This result indicates that the animals were motivated enough in the dry conditions to move to a brighter area and could detect and respond to the UV light ($P < 0.001$ *G* test).

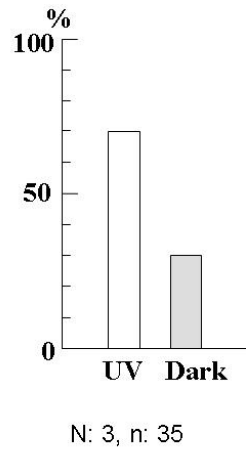


Figure 3 Results of binary choice experiments. White Bar: sandhoppers (%) orientated towards the UV light source, Grey Bar: sandhoppers (%) orientated towards the dark. N: number of trials carried out, n: number of animals released summing across all 3 trials

The ERGs were recorded from the surface of the crystalline cone of the compound eyes after at least 30 min dark adaptation. The response was an "on" negative potential consisting of an initial phasic component followed by a maintained or plateau component which lasted for the total duration of the illumination. At low levels of illumination and intermediate levels of illumination for this spectral response measurement, only the plateau component was recorded. We measured each response height of the plateau component. The response height when irradiated by the highest light intensity (1.8×10^{14} quanta/cm²/s) showed below 1 mV. Under -2.0 log light, the signals of each response were hard to distinguish from the noise level, thus we could obtain only 2.0 log unit responses. Figure 4 shows the amplitude of the plateau component of the ERG plotted as a function of log intensity of the stimuli of different wavelengths. The slopes of these response heights against the different log light intensities (V-log I) functions for the plateau components varied with stimulus wavelength, suggesting the presence of different receptor types.

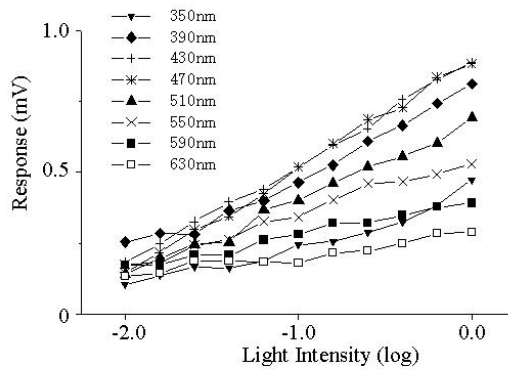
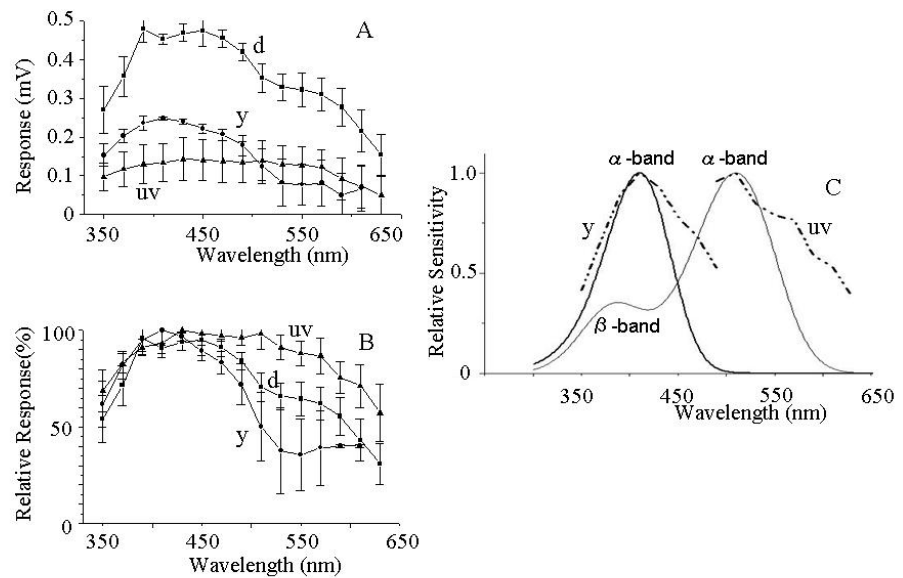


Figure 4 Relationship between the intensity of monochromatic light and response measured by electroretinogram. Eight monochromatic lights of various intensities were successively applied. The maximum intensity (log 0) was 1.8×10^{14} quanta/cm²/s

Because the V-log I functions in ERG measurements suggested the existence of different receptor types, the spectral characteristics are shown only by the response curve, not by the sensitivity curve (Fig. 5). The spectral response curve (SR (λ)) of dark-adapted compound eyes of *T. saltator* showed broad responses from UV (350 nm) to red (630 nm) (Fig.5A, B). The maximum response was observed from 390 - 450 nm, and the secondary peak was observed around 550 nm. In order to clarify the existence to different spectral receptor types, we performed a selective light adaptation experiment. Monochromatic light, either 380 nm or 580 nm, was irradiated for 3 min. as the former light adaptation. Following the former light adaptation, each adapting light was irradiated whole through the spectral response measurement. Ultraviolet light adaptation showed a large decrease in sensitivity but did not isolate different receptor types (Fig.5A, uv), whereas yellow light (580 nm) adaptation experiments showed the apparent sensitivity change around the secondary sensitive range (Fig.5A, y). Each response was normalized to the

highest response of the spectral response curve under dark conditions (Fig.5B). Compared with the dark adapted curve, ultraviolet light adaptation showed a higher response above 450 nm, and the yellow light adaptation



showed the lower response in the same spectral range.

Figure 5 Spectral response curves (A), normalized spectral response curves (B), and normalized spectral sensitivity curves peaking at 410 nm and at 510nm (dashed lines) drawn with the normalized absorbance spectra predicted by Stavenga et al.(1993). d: dark adapted, y: yellow light (580 nm) adapted, uv: ultraviolet light adapted (380 nm) curves

Morphological observations

The eyes of *T. saltator* are compound and sessile, occupying the dorsal lateral region of the head, and show a spherical shape with a diameter of ca 0.6 mm. Using a dissection light-microscope, a black pseudopupil and the number of ommatidia were observed (Fig.6A). The ommatidium, which is the structural unit of the compound eye, was seen forming a hexagonal lattice (Fig.6A insertion). The ommatidial centre-to-centre distances were ca. 35 μ m. Surprisingly, scanning microscopy revealed that the cornea itself was unlike that of other similar crustaceans (Fig. 6B), that is, the entire compound eye was smoothly convex like a camera eye. No apparent borders between each

ommatidium and between the compound eye and the head were observed. The cornea itself is approximately 15 μm thick and consists of five layers (Fig. 5C). The crystalline cone, which is the products of two cells, lies directly below the cornea and is attached to the tip of the rhabdom of the retinula cells. In the dorsal regions of the eye, the length of the crystalline cones was approximately 60 μm and their maximum diameter was 35 μm just below the cornea (Fig. 6C).

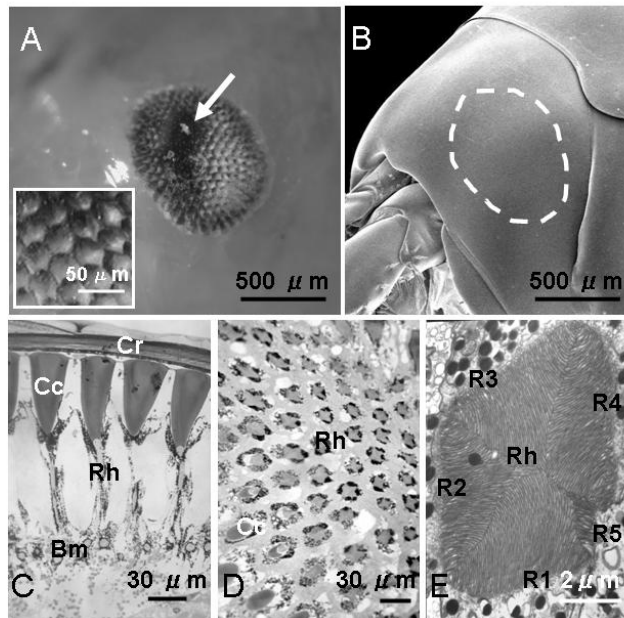


Figure 6 A: Light microscopic observations of the compound eye of *T. saltator*. Arrow indicates a black pseudopupil. B: Scanning electron micrograph of the outer surface of the cornea. No border between each ommatidium was observed. C: longitudinal section showing the cornea, crystalline cone and rhabdoms. D: transverse section showing rhabdoms. E: five retinula cells in one ommatidium observed using transmission electron microscopy. Cr: cornea, Cc: crystalline cone, Rh: retinula cell layer, Bm: basement membrane, R1-R5: retinula cells

The fused-type rhabdom was observed in the transverse section (Fig. 6D, E); its mean length is 70 μm related to the central ommatidia, while the ommatidia at the edge of the eye are shorter. The transmission electron microscopic observations revealed microvilli in each retinula cell which was oriented towards the centre of the rhabdom, as well as the existence of four large (R1-4) and one small (R5) retinular cell (Fig. 6E). Retinular cells 2 and 4 are located opposite each other and have the similar microvillar orientation, and

the cells 1 and 3 faced each other showing the similar microvillar orientation. The rhabdomere of the fifth retinular cell is smaller than those of the other four (only about 15% of rhabdomal area) in the cross-section area of each rhabdomere. Each retinular cell contains, in addition to the normal organelles, a large amount of electron dense pigment granules (mean diameter 0.4 μm) surrounding the rhabdom (Fig. 6 D, E).

DISCUSSION

Since the ground-breaking report by Karl von Frisch (1967), many papers have centred on the homing behaviour of social insects such as honeybees and ants, and showed that eyes are essential to detect a variety of environmental clues (Wehner, 1992). In addition to those reports by social insects, Hironaka et al. (2003) reported that the female of the subsocial shield bug, *Parastrachia japonensis* loses directional orientation with respect to the foraging place when the visual information is disturbed. It should be underlined that the ecological problem *T. saltator* has to solve is to reach the goal represented by a belt of damp sand (i.e. no homing behaviour). To do that sandhoppers use the visual clues for their orientation in order to follow the shortest path to recover the belt of damp sand of the beach. They can orient by the sun and from the blue sky when the sun is not visible (Pardi and Papi, 1953, Ugolini et al., 1993, 1996, 2004).

Spectral filtering experiments during orientation under the blue sky indicated the possibility that *T. saltator* perceives the ultraviolet (UV) – blue range; however, no direct proof of real UV perception in sandhoppers was demonstrated, even though it had often been hypothesized in the past (Ugolini et al., 1993, 1996, 2004). The binary choice experiments clearly showed that *T. saltator* responds to UV light by acting with photopositive behaviour: UV light attracted ca. 70% of the specimens.

In addition to the evidence of the spectral sensitivity in UV region by these behavioural experiments, we carried out spectral response measurements electrophysiologically. A broad peak was observed around 390 - 450 nm, and the secondary peak was observed around 500-550 nm from the dark adapted eye. UV light adaptation showed a decrease in the total response, whereas yellow light (580 nm) adaptation induced the diminishment of the secondary peak. These results strongly suggest the existence of at least two different spectral cell types; the UV cell and the yellow cell. The spectral absorbance curves of the two different visual pigments peaking α -band at 510 nm and β -band at around 380 nm, and peaking α -band at 380 nm predicted by a template (Stavenga et al., 1993) are shown in Fig. 5C, respectively. The UV light might be absorbed both by the shorter wavelength peak (β -band) of the yellow absorbing visual pigment in the yellow cell and by the main peak (α -band) of the UV absorbing visual pigment in the UV cell. Because UV light was

absorbed by these two different cells, the whole spectral response curve measured by ERG might be decreased. The visual pigment peaking α -band at UV region cannot absorb yellow light, so that the yellow light adaptation caused the apparent change in the shape of the spectral response curve. Because the Vlog I functions in ERG measurements showed the lack of the principle of univariance (Naka and Rushton, 1966) suggesting the existence of different receptor types, we calculated only the narrow spectral sensitivity curves around each peak using the light adapted response curve and the V-log I function of the peak wavelength. The dashed line “y” adapted by the light of 580nm fits well to the α -band curve of the predicted UV absorbing visual pigment, however, the dashed line “uv” adapted by ultraviolet light possesses broader sensitivity in longer wavelength region, suggesting the existence of other cell which responds in longer wavelength. (Fig.5C)

These behavioral and electrophysiological experiments revealed the existence of the UV perception in *T. saltator*. The UV perception is known in insects (e.g. see Wehner, 1992) and in some Crustaceans such as semi-terrestrial species, *Ligia* (Hariyama and Tsukahara, 1993) and marine species, (Marshall et al., 2007). However, as far as we know, this is the first report to clarify that the amphipod *T. saltator* responds to UV light.

It should be noted that the ERG is a gross response from the whole eye, and selective light adaptation experiments may sometimes poorly separate different receptor types when the spectral regions of each receptor are close together. Because of this difficulty of receptor isolation, there is a possibility, especially in the broad peak between 390 nm to 450 nm, other color receptors may exist. Further study is needed to clarify all spectral cell types using intracellular recording and/or microspectrophotometry methods.

Morphological observations revealed that *T. saltator* possesses an undifferentiated cornea and five retinula cells in each ommatidium as other amphipods (Ball, 1977, Hallberg *et al.*, 1980), including one small cell producing a rhabdomere and other big retinula cells (Ercolini, 1964). The eye of *T. saltator* is classified as an apposition compound eye because of the fused rhabdom which is attached to the crystalline cone. Investigations on eye structure and spectral sensitivity have been carried out in many arthropod species (e.g. see Goldsmith and Fernandez, 1968, Land, 1981, Frank and Widder, 1999, Osorio and Vorobyev, 2005), and some of those studies clearly showed the relationship between the lens system and the light environment. Animals that possess superposition eyes live in dim light environments such as the deep sea or dark caves or are active at night, whereas those with apposition eyes live in bright light environments and are active during the day. These structural differences in lens systems are well correlated with the arthropods' behavioural environments (Nilsson, 1983). In addition to the clear categorization described above, recent studies revealed several evidences that animals have evolved to be nocturnal despite their apposition eyes (Warrant,

2008). *T. saltator* habits crepuscular and nocturnal (Geppetti and Tongiorgi, 1967a, b), and can orient both in day and night using celestial cues such as the sun and the moon (Ugolini *et al.*, 2007). The apposition eye in *T. saltator* seems to be suited for both diurnal and nocturnal vision. Because UV sensitivity seems redundant during the night (Lythgoe, 1976, White *et al.*, 1994), these characteristics of the vision system of sandhoppers seem better adapted for vision in bright daylight than in nocturnal dim light. *T. saltator* might change the visual system depending on the light condition.

References

- Ball, E.E.** 1977. Fine structure of the compound eyes of the midwater amphipod *Phronima* in relation to behaviour and habitat. *Tissue & Cell* **9**: 521-536.
- Ercolini, A.** 1964. Sulla struttura degli occhi composti di *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea-Amphipoda). *Redia* **49**: 129-135.
- Ercolini, A., & F. Scapini.** 1976. Sensitivity and response to light in the laboratory of the littoral amphipod *Talitrus saltator* Montagu. *Mon. Zool. Ital.* (N.S.) **10**: 293-309.
- Frank, T.M. & E.A. Widder.** 1999. Comparative study of the spectral sensitivities of mesopelagic crustaceans. *J. Comp. Physiol. A* **185**: 255-265.
- Frisch, K. von.** 1967. *The dance language and orientation of bees*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Geppetti L., & P. Tongiorgi.** 1967a. Ricerche ecologiche sugli Artropodi di una spiaggia sabbiosa del litorale tirrenico. II Le migrazioni di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea – Amphipoda). *Redia* **50**: 309-336.
- Geppetti L., & P. Tongiorgi.** 1967b. Nocturnal migrations of *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). *Monit. Zool. Ital.* (N. S.), **1**: 37-40.
- Goldsmith, T.H., & H.R. Fernandez.** 1968. Comparative studies of crustacean spectral sensitivity. *Z. Vergl. Physiol.* **60**: 156-175.
- Hallberg, E., H.L. Nilsson, & R. Elofsson.** 1980. Classification of amphipod compound eyes - the fine structure of the ommatidial units (Crustacea, Amphipoda). *Zoomorph.* **94**: 279-306.
- Hariyama, T., & Y. Tsukahara.** 1993. Spectral responses, including a UV-sensitive cell type, in the eye of the Isopod *Ligia exotica*. *Naturwissenschaften* **80**: 233-235.
- Hironaka, M., S. Nomakuchi, L. Filippi, S. Tojo, H. Horiguchi, & T. Hariyama.** 2003. The directional homing behaviour of the subsocial shield bug, *Parastrachia japonensis* (Heteroptera: Cydidae), under different photic conditions. *Zool. Sci.* **20**: 423-428.
- Hunt, D.M., S.E. Wilkie, J.K. Bowmaker, & S. Poopalasundaram.** 2001. Vision in the ultraviolet. *Cell. Mol. Life Scie.* **58**: 1583-1598.
- Johnson, M.L., E. Gaten, & P.M.J. Shelton.** 2002. Spectral sensitivities of

- five marine decapod crustaceans and a review of spectral sensitivity variation in relation to habitat. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **82**: 835-842.
- Land, M. F.** 1981. Optics and vision in invertebrates. Pp. 471-592 in H. Autrum (ed) *Handbook of Sensory Physiology*, vol. VII/6B, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer.
- Lythgoe, J.N.** 1979. *The ecology of vision*. Clarendon Press, Oxford.
- Marshall, J., T.W. Cronin, and S. Kleinlogel.** 2007. Stomatopod eye structure and function: A review. *Arthr. Struct. Dev.* **36**: 420-448.
- Mezzetti, M.C., & F. Scapini.** 1995. Aspects of spectral sensitivity in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* **26**: 35-45.
- Naka, K.I., & Rushton W.A.** 1966. S-potentials from colour units in the retina of fish (Cyprinidae). *J. Physiol.* **185**: 536-555.
- Nilsson, D.E.** 1983. Evolutionary links between apposition and superposition optics in crustacean eyes. *Nature* **302**: 818-821.
- Osorio, D., & M. Vorobyev.** 2005. Photoreceptor spectral sensitivities in terrestrial animals: adaptations for luminance and colour vision. *Proc. R. Soc. B.* **272**: 1745-1752.
- Papi, F.** 1960. Orientation by night: the moon. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **25**: 475-80.
- Papi, F., & L. Pardi.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator*. II. Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte. L'orientamento diurno di altre popolazioni. *Z. Vergl. Physiol.* **35**: 490-518..
- Pardi, L., & F. Papi.** 1952. Die Sonne als Kompass bei *Talitrus saltator* (Montagu). *Naturwissenschaften* **39**: 262-263.
- Pardi, L., & F. Papi.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico. *Z. Vergl. Physiol.* **35**: 459-489.
- Pardi, L., & A. Ercolini.** 1986. Zonal recovery mechanism in talitrid crustaceans. *Boll. Zool.* **53**: 139-160.
- Stavenga, D.G., R.P. Smits, & B.J. Hoenders.** 1993. Simple exponential functions describing the absorbance bands of visual pigment spectra. *Vision Res.* **33**: 1011-1017.
- Ugolini, A.** 2001. Relationship between compass systems of orientation in equatorial sandhoppers. *Anim. Behav.* **62**: 193-199.
- Ugolini, A.** 2003. Activity rhythms and orientation in sandhoppers (Crustacea, Amphipoda). *Front. Biosci.* **8**: 722-732.
- Ugolini, A., F. Scapini, & L. Pardi.** 1986. Interaction between solar orientation and landscape visibility in *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). *Mar. Biol.* **90**: 449-460.
- Ugolini, A., B. Laffort, C. Castellini, & G. Beugnon.** 1993. Celestial orientation and ultraviolet perception in *Talitrus saltator*. *Ethol. Ecol. Evol.* **5**: 489-499.

- Ugolini, A., B. Vignali, C. Castellini, & M. Lindström, M.** 1996. Zonal orientation and spectral filtering in *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *J. Mar. Biol. Ass. UK* **76**: 377-389.
- Ugolini A., C. Melis, R. Innocenti, B. Tiribilli, & C. Castellini.** 1999. Moon and sun compasses in sandhoppers rely on two separate chronometric mechanisms. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**: 749-752.
- Ugolini, A., C. Castellini, & B. Tiribilli.** 2004. The orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* during a partial solar eclipse. *J. Comp. Physiol. A* **190**: 855-859.
- Ugolini, A., S. Somigli, & L. Mercatelli.** 2006. Green land and blue sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *J. Exp. Biol.* **209**: 2509-2514.
- Ugolini, A., C. Castellini, & L. Mercatelli.** 2007. Moon orientation on moonless nights. *Anim. Behav.* **73**: 453-456.
- Warrant, E.J.** 2008. Seeing in the dark: vision and visual behaviour in nocturnal bees and wasps. *J. Exp. Biol.* **211**: 1737-1746.
- Wehner, R.** 1992. *Homing in Arthropods*. Pp. 45-144 in F. Papi (ed.) *Animal Homing*, London: Chapman and Hall.
- White, R.H., R.R. Stevenson, A. Bennet, D.E. Cutler, & W.A. Haber.** 1994. Wavelength discrimination and the role of ultraviolet vision in the feeding behaviour of hawkmoths. *Biotropica* **26**: 427-435.
- Zar, J.H.** 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs.

CAPITOLO 3

SKYLIGHT POLARIZATION AND COMPASS ORIENTATION IN SANDHOPPERS: MYTH OR REALITY?

¹Ugolini A., ¹Galanti G., ²Mercatelli L., ³Hariyama, T.

1. Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze, Via Romana 17, 50143 Firenze, Italy.
2. Istituto Nazionale di Ottica Applicata – CNR, Largo E. Fermi 6, 50143 Firenze, Italy
3. Department of Biology, Hamamatsu University School of Medicine, 1-20-1, Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, Japan

In preparation

Nota: Gli esperimenti descritti in questo capitolo sono stati effettuati in collaborazione con la Dott.sa Emma Ristori.

INTRODUCTION

More than 50 years ago Pardi and Papi (1952, 1953) found that the amphipod *Talitrus saltator* maintains the sea - land axis direction to return to the damp belt of sand in which it lives during the day. To do that it uses the sun compass mechanism. The same mechanism was found almost contemporary in Honeybees (Von Frisch, 1946) and in Starlings (Kramer, 1951). Going in depth in their research Pardi and Papi found others orientating factors of astronomical or celestial (sky) nature used by sandhoppers in their zonal recovery, e.g. the moon (Papi and Pardi, 1953), and the skylight polarization (Pardi and Papi, 1953). Their experiments on sandhoppers were carried out in confined environment (a glass bowl) using the same polarizing filters Von Frisch used in its tests on bees (Pardi, personal communication, see also Von Frisch, 1967). However, Pardi and Papi (1953) clearly pointed out that the behaviour of the individuals under the polarizing filter was dramatically different with respect to that registered in normal tests without the filter; in fact, animals under the Pol-filter were not orientated radially (i.e. with the long body axis in accordance with the radius of the bowl) and frequently changed their positions in the bowl. In these conditions sandhoppers show evident stress signals, like the formation of clusters: each individual try to hide himself under the others to prevent dehydration, instead to assume the ecologically efficient (seaward) direction. The same Authors, however, noted that with some positions of the axis of the Pol filter sandhoppers modified their clustering position in the bowl, still not radially orientated.

More recently the perception and use of the skylight polarization in the spatial orientation of many Invertebrates especially Arthropods has been deeply investigated (see Jander and Waterman 1960, Waterman 1981, Wehner, 1992, Eguchi 1999, Labhart and Meyer 1999, Horvath and Varju 2004 for revisions); however, no further experiments were carried out in sandhoppers to date. However, in the literature on the use of pol-light in animal orientation the quotation of the paper by Pardi and Papi (1953) can be easily found. Many papers report the existence of a celestial orientating factor that sandhoppers perceive in the UV - blue range (Ugolini et al., 1996, 2001, 2004), often hypothesised as the skylight polarization pattern. However, no new releases were carried out to verify the pol-light compass orientation in sandhoppers. In summary, the pol light compass orientation in *T. saltator* seems a traditional acquisition more than a solid demonstration.

Recently we found a new celestial factor, the skylight intensity gradient, that sandhoppers can use in the absence of the direct vision of the sun (Ugolini et al., 2009). This could explain the ability of *T. saltator* to make the correct directional choice even when the sole vision of the blue sky is allowed.

For these reasons we decided to test the capacity of *T. saltator* to perceive and use the polarization pattern of the sky as a compass cue.

MATERIALS AND METHODS

We used adult individuals of *T. saltator* (Montagu) collected from a beach in the Natural Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa, Italy). The sea-land direction of the Y-axis (perpendicular to the shoreline) is 264°-84°.

After their capture, the sandhoppers were transferred to the laboratory and kept in Plexiglas boxes containing wet sand, in conditions of natural temperature and artificial photoperiod (L:D) corresponding in phase and duration to the natural one. Food (universal dried food for fish, SERA Vipan) was constantly available.

Experiments under artificial light

Laboratory tests were conducted in the morning (10 - 11 a.m.), in a dark room.

Releases were carried out using the experimental apparatus showed in Fig. 1. It consists of a Plexiglas tube (60 cm long, diameter 6.3 cm) horizontally placed. As an emitting source we used a Xenon lamp (lamp: XBO150W Osram, Germany), the beam, collimated by a lens is then split in two beams that, by means of mirrors reach the two ends of the corridor. At the two extremities, interference filters (Blue: 435 nm Andover Corporation, USA) were placed in the black cap: the only light transmitted in the tube was the light transmitted by the filters. We also used a neutral density filter to equalize the light intensity of each beam. At one end of the cylinder we placed a polaroid filter (HN42HE, 3M Norwood, MA, USA, Fig. 2A) in order to linearly polarize the beam of light from one side. A power meter (receptor head PD300UV, Nova Display, Ophir Optronics) centred in the middle of the Plexiglas tube measured light intensity. For each release, 10 – 12 specimens were placed at the middle of the Plexiglas tube with a help of a transparent narrow Plexiglas cylinder vertically inserted into the hole. Sandhoppers were thus prevented from escaping in any direction and were kept in dry conditions. After 2 minutes, the light beam was allowed to penetrate the tube from one end, or from both ends depending on the test, and sandhoppers were released by the removal of the vertical cylinder. The numbers of specimens that fell into pitfall traps located at the two ends of the corridor were counted 2 minutes after release. Data was statistically analysed by *G* test ($P < 0.05$ at least; Zar, 1984).

We carried out three different binary choice tests:

- White light linearly polarized (intensity: 2,920 μ W) vs White light not polarized (intensity: 2,927 μ W)
- Blue light linearly polarized (intensity: 1,8 μ W) vs Blue light not polarized (intensity: 1,789 μ W)
- Green light linearly polarized (intensity: 1,4 μ W) vs Green light not polarized (intensity: 1,5 μ W)

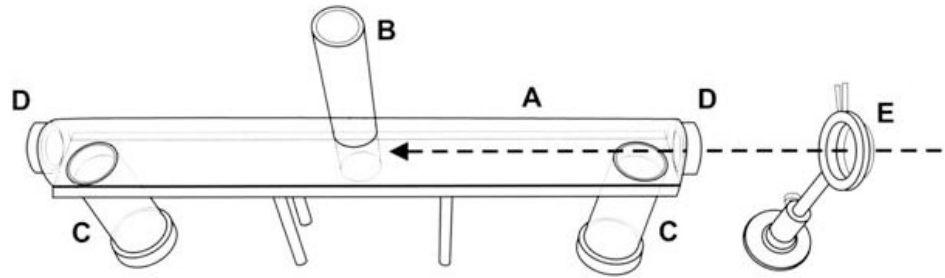


Figure 1 Experimental device for binary choice experiments. A: Plexiglas tube arena, B: Plexiglas cylinder to keep the specimens in dry condition, C: traps for the specimens, D: ultra-violet light emitting end of controlled light intensity, E: lens projecting parallel light into the arena

Experiments under natural sky

The experiments were conducted in Florence, from 9 to 10 a.m. and around sunset (from 8 to 9 p.m.). The irradiance in the morning is approximately 5 mW/cm^2 while at sunset is around $1 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ (measures were made by a power meter Nova Display, Ophir Optonics, with receptor head PD300UV and filter Schott BG38 superimposed on it) and decreases exponentially reaching $0.01 \text{ } \mu\text{W/cm}^2$ 30 min after sunset. The experimental apparatus was similar to the one used by Pardi & Papi (1953), slightly modified (Ugolini & Macchi 1988). The device consisted of a transparent Plexiglas bowl (h: 5 cm, Ø: 20 cm or h: 5 cm, Ø: 15 cm) set on a goniometer placed on a circular transparent Plexiglas plate (Ø: 30 cm) set horizontally on a tripod. A white Plexiglas screen (h: 5cm, Ø: 30 cm) placed around the bowl blocked the view of the surrounding landscape but allowed vision of the sun and sky. Sandhoppers were dehydrated for a few minutes and then released in the Plexiglas bowl on a dry substratum.

In control releases sandhoppers could see the natural sun and sky. During the experimental trials we placed alternatively two different UV-A transmitting linear polarizer: HN42HE (3M, Norwood, MA, USA, 17,5 cm x 17,5 cm, Fig. 1A) and HN22 (Polaroid corp., Cambridge, Mass., 42 cm x 42 cm, Fig. 1B) over the bowl containing the animals. The same type of filters were already used for pol-light compass experiments by ,e.g., Stalleiken et al. (2005) for tests on *Danaus plexippus* and by Dacke et al. (2001, 2003, 2004) for spiders and *Scarabeus zambesianus*. During the experiments the axes of the filter was placed in order to not modify the skylight polarized pattern. In case of

filter axis in agreement with sky polarization, the radiance loss along solar meridian between the brightest and the dimmest point (in the range 50°-130° of elevation), is -53.2%. Furthermore the filter was turned manually (clockwise or anticlockwise by 90°) to simulate a 90° switch of the polarised pattern of skylight to test whether a shift in orientation would occur. In this case when the filter is in opposition respect to the sky polarization (turned of 90°) the radiance loss is -68.2%.

The exact orientation of the filter had to be adjusted according to the azimuth of the sun at the time of the tests.

Tests conducted during the morning were performed both with the sun visible and screened out using a wooden panel.

The directional choices of the animals were recorded during the test using a mirror placed under the bowl (test with the HN42HE filter) or taped using a video camera (test with the HN22 filter). We annotated only the direction of animals radially oriented (i.e. the individuals with the head turned toward the external side of the bowl and with the longitudinal axis of the body perpendicular to the side of the bowl); the animals that remained still for long time or with the longitudinal axis of the body not perpendicular to side of the bowl were considered not radially oriented. The tests recorded on the tape were successively seen on a monitor and were recorded the direction of the sandhoppers. Moreover, in order to better compare our findings with those of Pardi and Papi (1953), we decided to ideally divide the bowl in four quadrants (quadrant 1: from 219° to 309°, quadrant 2: from 309° to 39°, quadrant 3: from 39° to 125° and quadrant 4: from 125° to 219°) and recorded the number of not radially oriented animals occurred in each quadrant.

Statistical analysis of the circular distributions was carried out with the methods reported by Batschelet (1981). The mean resultant vector was calculated for each distribution. V test was used to ascertain whether the distribution differed from uniformity ($P < 0.05$ at least). The differences among the percentages of not radially oriented sandhoppers recorded in each quadrant were assessed using the G-Test.

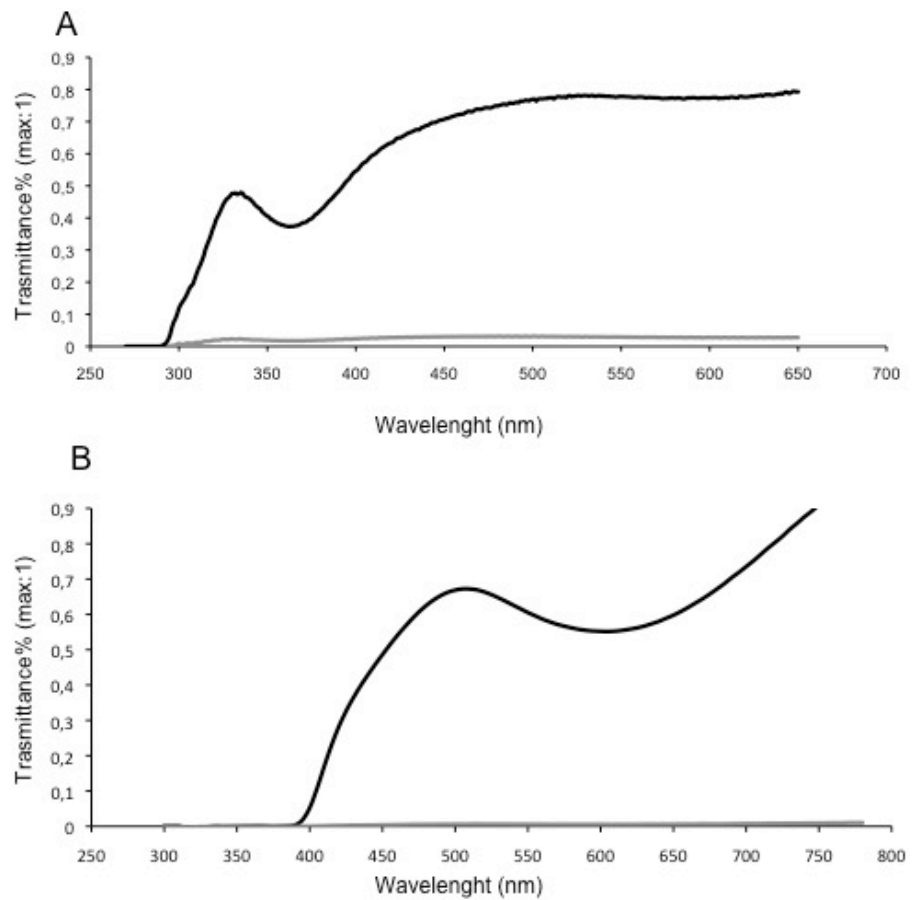


Figure 2 Transmittance of the two Pol-filters used in the experiments. A, filter HN42HE; B, filter HN22.

RESULTS

Experiments under artificial light

Tested in white light (Fig. 2A) sandhoppers choose at random one of the two beams ($G= 1.607$, $df=1$, $P=NS$, G test); however a slight preference for the polarized beam can be observed ($\approx 57\%$, $n= 36/63$). Instead, a clear, statistically significant preference for the polarized beam can be observed under the blue light ($G= 12.171$, $df= 1$, $P<0.001$, G test) (Fig. 2B). Tested in green

light (Fig. 2C) sandhoppers do not show any significant preference for one of the two beams ($G = 0.066$, $df = 1$, $P = \text{NS}$, G test).

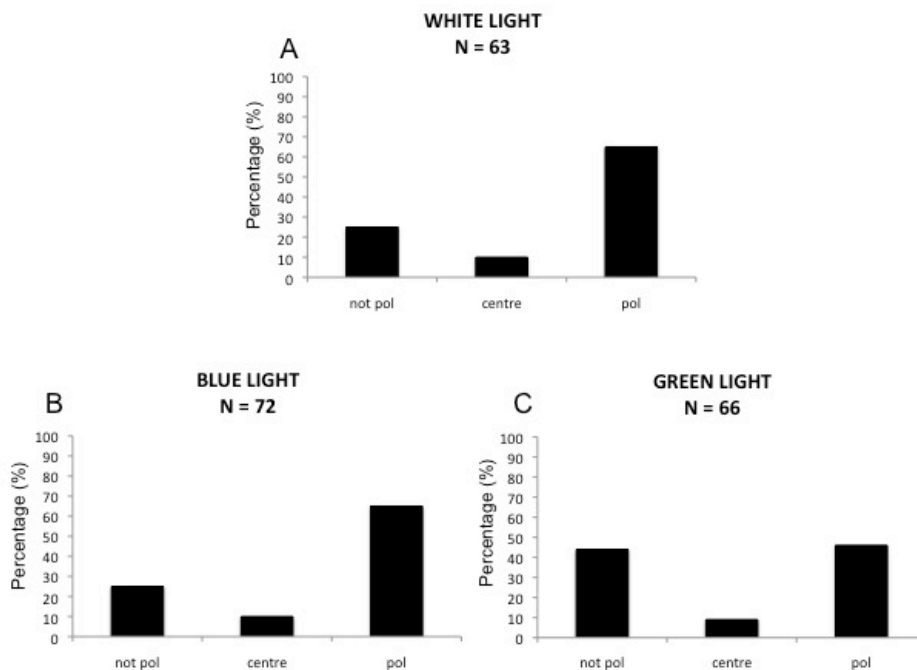


Figure 3 Tests of binary choice between two beams of polarized and not polarized artificial light of different wavelengths: A white light (Xenon lamp), B blue light (435nm), C green light (546nm). In each diagram the frequency of individuals that choice for one of the two beams and the not-choice individuals are represented. N, sample size

Experiments under natural sky

Releases made during the morning reveal that sandhoppers tested directly under the sun and blue sky (controls) (Fig. 4A) show a directional choice in agreement with the theoretical expected direction (TED). The animals maintain a good orientation toward the TED also when the sun was screened out (Fig. 4B).

Sandhoppers tested under the Polaroid filter (both HN22 and HN42HE) when the position of the axes of the filters did not modify the skylight polarized pattern continue to orient correctly toward the sea - land direction of their home beach (Fig. 4C, Fig. 5A). This is not true for tests carried out with the filter HN22 and the sun screened out (Fig. 4D): in this case in fact the animals were not able to orient toward any direction and we recorded the 90% of the animals not radially oriented. The rotation of the axe of the filter of 90° (clockwise and

anticlockwise) did not influence the directional choice of the animals that still maintained an orientation toward the TED (Fig. 4E, Fig. 5C, D) excepted with the filter HN22 and the sun screened (Fig. 4 F), in this test indeed we recorded more than 90% of not radially oriented animals.

The releases carried out at sunset revealed results similar to those obtained with the morning tests. The animals tested in the control release show a good orientation toward the TED (Fig. 4G). The same occurred with sandhoppers released under the HN22 filter (Fig. 4H), the rotation of 90° of the filter did not influence the directional choice of sandhoppers (Fig. 4I). The animals tested under the HN42HE filter at sunset assumed an uniform distribution both when the skylight polarization pattern was unaltered and when it was modified (Fig. 5E, F).

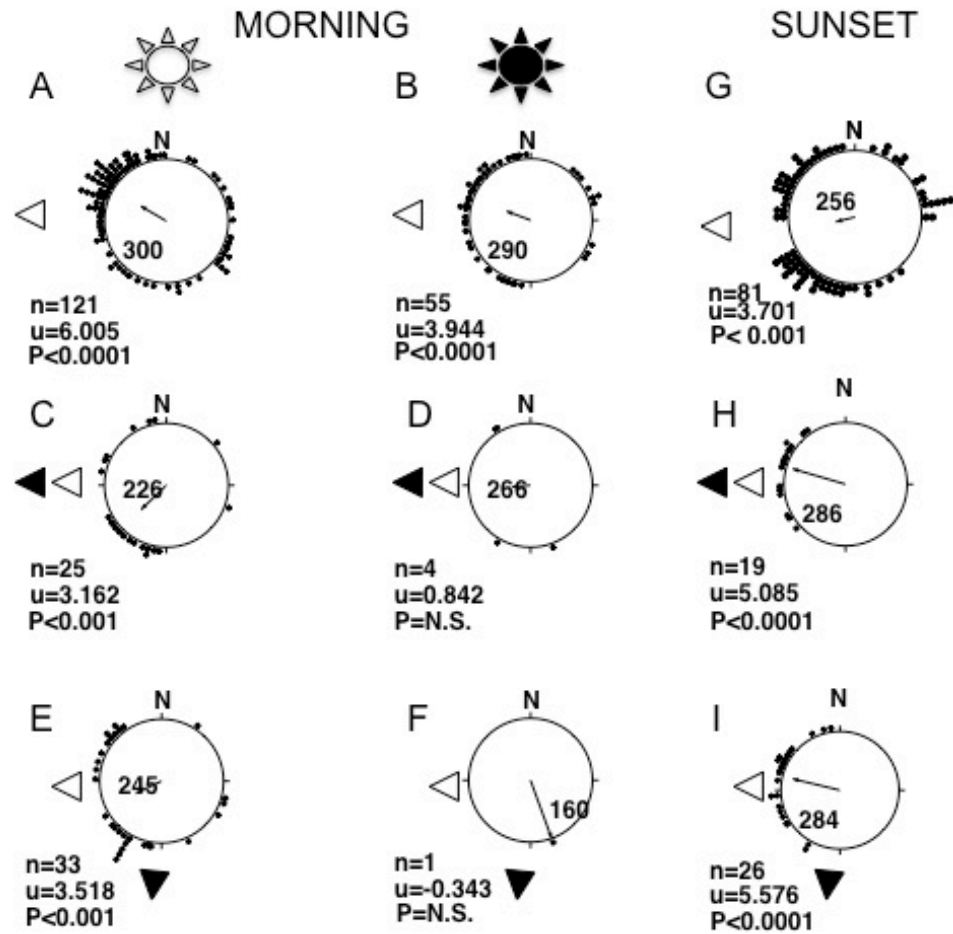


Figure 4 Orientation of sandhoppers released during the morning and at sunset under the filter HN22 A, Control with vision of the sun and sky only; B, Control with vision of the sky only (sun screened out), C, under the HN22 filter with the

skylight polarized pattern not modified D, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern not modified and the sun screened out, E, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise F, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise and the sun screened out, G, Control with vision of the sun and sky only at sunset, H, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern not modified at sunset, I, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise at sunset. White triangle, seaward direction; Black triangle, orientation direction expected by the rotation of the filter; White sun, sun visible; Black sun, sun screened out; dots, direction of movement of sandhoppers (one per dot); black arrow, mean vector and angle (the length of the mean vector ranges from 0 to 1 = radius of the circle); n: sample size; u, V-test value with the probability level P.

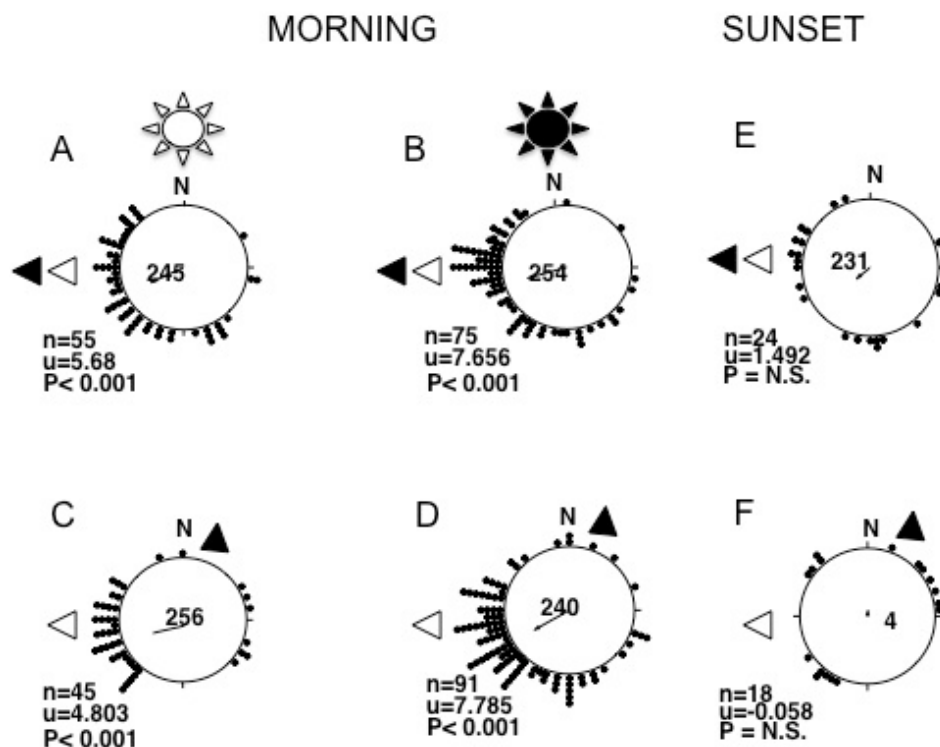


Figure 5 Orientation of sandhoppers released during the morning and at sunset under the filter HN42HE A, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern not modified, B, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern not modified and the sun screened out, C, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° clockwise D, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° clockwise and

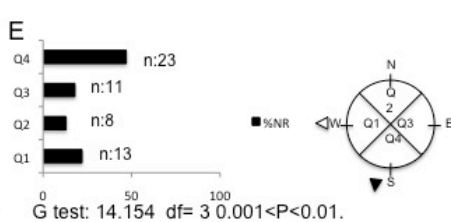
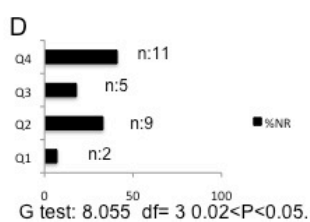
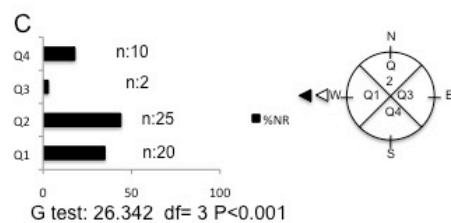
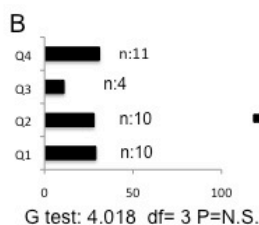
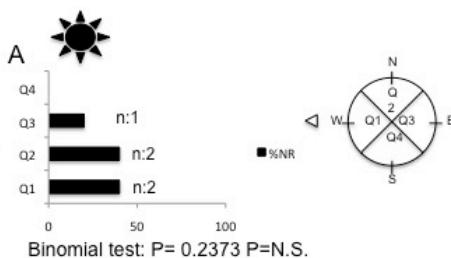
the sun screened out, E, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern not modified at sunset, F, under the HN42HE filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° clockwise at sunset. For further explanations see figure 1.

The bar charts in Fig. 6 show the percentage of not radially oriented animals recorded in each quadrant. As it is possible to notice by these graphs in the tests conducted during the morning there are a high percentage of not radially oriented animals located in the quadrants containing the orientation direction expected by the rotation of the filter (Fig. 6B, C, D, E). At the opposite the graphs obtained from the experiments carried out at sunset revealed a uniform distribution among quadrants (Fig. 6F, G, H).

MORNING



CONTROL



SUNSET

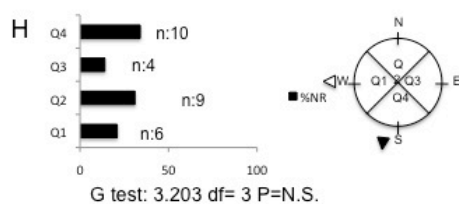
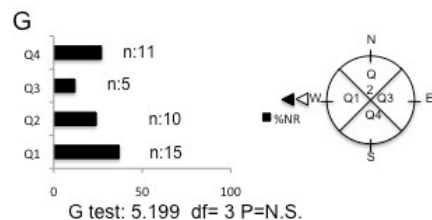
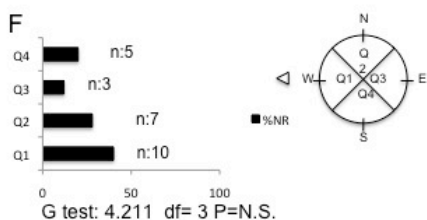


Figure 6 Percentage of sandhoppers for each quadrant. A, Control with vision of the sky only (sun screened out), B, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern not modified C, under the HN22 filter with the skylight

polarized pattern not modified and the sun screened out, D, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise E, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise and the sun screened out, F, Control with vision of the sun and sky only at sunset, G, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern not modified at sunset, H, under the HN22 filter with the skylight polarized pattern rotated by 90° anticlockwise at sunset. Black bar, percentage of animals recorded in each quadrant, n, number of animals recorded. For each graph we report a circular representation of the position of the quadrant and the expected direction, White triangle, seaward direction; Black triangle, orientation direction expected by the rotation of the filter.

DISCUSSION

In our tests under the rotated pol-filter sandhoppers show evident signals of stress due to lack of clear directional indication. It could depend on the absence of orientating cues or on the conflict (not concordance) between directional indications. In fact, the clusters formation should be interpreted as an alternative strategy for surviving when no strong and clear orientating factors are present. To hide each under the other is interpreted as an attempt to find/maintain some humidity in a high stressful environment. The same behaviour, in fact, is exhibited by *Talorchestia martensii*, an Equatorial species, when released in group in a confined environment, during the zenithal culmination of the sun (see Pardi et al. 1984, Ugolini and Pardi 1992), i.e. when no other orientating factor is available, but the geomagnetic field (Ugolini 2001). In group releases, however, despite *T. martensii* possess a good magnetic compass mechanism of orientation the strategy that brings to clusters formation is preferred. Therefore, without to deny the existence of a magnetic compass in *T. saltator*, we believe that the clustering behaviour registered in our tests is due to lack of directional information coupled with a change of surviving strategy to prevent/reduce dehydration.

It is also true, however, that in some releases (Fig. 4 C, D, E) a certain tendency to accumulate in the expected quadrant can be seen. However, in accordance with the findings of Pardi and Papi (1953) these accumulations are formed by not radially orientated individuals: i.e. during the tests the most part of sandhoppers turn around walking and accumulate in a preferred quadrant but this behaviour does not show the characteristics of a menotactic orientation.

At this point, however, we must ask ourselves about what *T. saltator* sees in the UV-blue range of wavelength, since it has been many times hypothesized that the orientation factor perceived in this range is the skylight polarised light (Pardi and Ercolini 1986, Ugolini et al., 1996, 2002, 2004). Releases of binary choice demonstrate that sandhoppers are able to discriminate between polarized and not-polarized beams of light only in the blue (450-470 nm) and that they prefer the polarized beam. However, it is not a demonstration of

the perception of the polarized light in sandhoppers. In fact, in the Japanese butterfly *Papilio xuthus* preliminary tests have been demonstrated that in the red wavelengths the pol light vision increase the contrast allowing the discrimination between two red lights (only one being linearly polarized) (Kinoshita et al, 2008). Therefore, we can speculate that in *T. saltator* the vision of the skylight polarization in the UV-blue wavelength range could increase the contrast between sky hemidome containing the sun and the opposite one. This finding could explain why in experiments of spectral filtering carried out under the blue sky (the sun screened out) allowing the perception of wavelengths larger than 310 nm the sandhoppers orientation capacity towards the ecologically efficient direction is very reduced (Ugolini et al. 1996).

Therefore, despite *T. saltator* presents all the anatomical requirements to utilize the pol light as a directional orientating factor (Mezzetti e Scapini, 1995, Ugolini et al., 1996, Ugolini et al 2009 in prep.), we can conclude that this species perceives the pol light but does not posses a pol light compass mechanism, despite a very good sun compass system of orientation.

Acknowledgements

We wish to thank Dr. Maria.Dacke (Lund University) for her kind loan of the HN22 Pol- filter, and Prof. R. Jander (University of Kansas) for the stimulating discussion of an early version of the manuscript. The research was financially supported by the Florence University (local funds ex-60%).

References

- Dacke, M., Byrne, M., Scholtz, C.H., & Warrant E.J.** 2004. Lunar orientation in a beetle. *Proc. R. Soc. B*, **271**, 361-365.
- Dacke M, Nilsson D-E, Scholtz CH, Byrne M & Warrant EJ** 2003. Insect orientation to polarized moonlight. *Nature* **424**, 33.
- Dacke M., Doan T. A. & O'Carrol D. C.** 2001. Polarized light detection in spiders. *J. Exp. Biol.*, **204**, 2481-2490.
- Eguchi E.** 1999. Polarized light vision and rhabdom. In: *Atlas of Arthropod sensory receptors* (Ed by Eguchi, E. & Tominaga, Y.) pp. 33-46. Springer.
- Frisch, K. Von** 1946. Die Tänze der Bienen. *Österr. Zoolog. Zeitschr.* **1**, 1–48.
- Frisch K. Von** 1967. The dance language and orientation of bees. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Horváth G. & Varijú D.** 2004. Polarization light in animal vision. Polarization patterns in nature. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Jander R. & Waterman T.H.** 1960. Sensory discrimination between polarized light and light intensity patterns by Arthropods. *J. Cell. Comp. Physiol.* **56**, 137-159 .
- Kinoshita M., Yamazato K. & Arikawa K.** 2008 Do papilio Butterfly see polarizaed light as color or brightness?. Abstract from The second

- International Conference of Invertebrate Vision, Backaskog Castle Sweden August 1-8, pp. 70.
- Kramer G.** 1952 Experiments on bird orientation. *Ibis*, **94**, 265-285.
- Labhart, T. & Meyer, E.P.** 1999. Detectors for polarized skylight in insects: a survey of ommatidial specializations in the dorsal rim area of the compound eye. *Microsc. Res. Tech.*, **47**, 368-379.
- Mezzetti M. C. & Scapini F** 1995. Aspects of spectral sensitivity in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea - Amphipoda). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.*, **26**, 35-45.
- Pardi L. & Ercolini A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans. *Boll. Zool.*, **53**, 139-160.
- Pardi L. & Papi. F.** 1952. Die Sonne als kompass bei *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea – Amphipoda). *Naturwissenschaften*, **39**, 262-263.
- Papi F. & Pardi L.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). II. Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte. L'orientamento diurno di altre popolazioni. *Z. Vergl. Physiol.*, **35**, 490-518.
- Pardi L., Ercolini A., Ferrara F., Scapini F. & Ugolini A.** 1984. Orientamento zonale solare e magnetico in crostacei anfipodi litorali di regioni equatoriali. *Atti Accademia Nazionale dei Lincei, Rendiconti* **76**, 312-320.
- Stallaiken J., Mukhida M., Labhart T., Whener R., Frost B. & Mouritsen H.** 2005. Do monarch butterflies use polarized skylight for migratory orientation?. *J. Exp. Biol.*, **208**, 2399-2408.
- Ugolini A.** 2001. Relationship between compass system of orientation in equatorial sandhoppers. *Anim. Behav.*, **62**, 193-199
- Ugolini A. & Macchi T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **121**, 79-87
- Ugolini A. & Pardi L.** 1992. Equatorial sandhoppers do not have a good clock. *Naturwissenschaften* **79**, 279-281.
- Ugolini A., Castellini C. & Tiribilli B.** 2004. The orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* during a partial solar eclipse. *J. Comp. Physiol. A*, **190**, 855-859.
- Ugolini A., Galanti G. & Mercatelli L.** 2009. Difference in Skylight intensity is a new celestial cue for sandhopper orientation (Amphipoda, Talitridae). *Anim. Behav.* **77**, 171-175.
- Ugolini A., Vignali B., Castellini C. & Lindström M.** 1996. Zonal orientation and spectral filtering in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **76**, 377-389.
- Waterman T. H.** 1981. Polarization sensitivity. In: *Handbook of sensory physiology. Vision in invertebrates*. (Ed. by H. Autrum) pp. 281-469 Vol. **VII/6B**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Wehner R. 1992. Arthropods. In: *Animal homing* (Ed. by F. Papi) pp. 45-144
Chapman & Hall London, New York, Tokio, Melbourne, Madras.

CAPITOLO 4

DIFFERENCE IN SKYLIGHT INTENSITY IS A NEW CELESTIAL CUE FOR SANDHOPPER ORIENTATION (AMPHIPODA, TALITRIDAE)

Alberto Ugolini^a, Giuditta Galanti^a and Luca Mercatelli^b

^aDipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università di Firenze, Italy

^bIstituto Nazionale di Ottica Applicata, Firenze, Italy

Animal Behaviour 2009 doi: 10.1016/j.anbehav.2008.09.035

ABSTRACT

We investigated the use of the skylight intensity gradient as a new celestial compass cue in sandhoppers (*Talitrus saltator*). Experiments were conducted at different latitudes (temperate and equatorial) with different zenithal distances of the sun under a translucent (opaline) Plexiglas dome. We also used a blue filter placed on the translucent dome to remove the spectral sky gradient, and a screen for the sun to remove the skylight intensity gradient. Therefore, in our experimental conditions, the spectral gradient and skylight polarization were impossible to use as directional information. Sandhoppers used the difference in skylight intensity in their directional choice when zenithal distance was greater than 10°. Therefore, the anisotropic radiance distribution (i.e. the difference in skylight intensity between the hemidome containing the sun and the opposite one) is a real celestial factor in animal spatial orientation. However, it is probably more imprecise than the solar orientation and could not be used by all animals.

Keywords: celestial cue; orientation; sandhopper; skylight intensity; *Talitrus saltator*

INTRODUCTION

The sandhopper *Talitrus saltator* is one of the oldest biological models for the study of animal orientation. Sandhoppers are known for their ability to use astronomical (sun, moon) and local (slope, landscape) cues to return to the band of wet sand along the sea–land axis of their home beach (see Pardi & Papi 1952). During the day this sun-based orientation is mainly based on their ability to compensate chronometrically for the apparent movement of the sun to maintain a constant direction of orientation throughout the day (Pardi and Papi, 1953, Ugolini et al., 2007).

Besides compass cues of orientation such as the sun and moon, many arthropods use other celestial cues, such as the skylight polarization and spectral distribution (Coemans et al., 1994, Campan, 1997, Wehner, 1997, Horvath and Varju, 2004). Moreover, Verheijen (1978) drew attention to the use of the anisotropic radiance distribution (the difference in skylight intensity between the hemidome containing the sun and the opposite one) as a possible orientation cue in vertebrates and invertebrates.

The use of celestial orientation cues such as the spectral gradient, polarized light pattern and skylight intensity gradient have been extensively studied in ants and bees (reviewed in Wehner 1997), and the use of the spectral gradient and polarized light pattern has also been hypothesized for *T. saltator*, although it has never been sufficiently demonstrated, since investigations of such cues have often failed to produce clear results (Pardi & Papi, 1953, see also Pardi & Ercolini, 1986). In fact, the perception and use of skylight

polarization has not been proved directly and the behavioural tests have not been completely convincing (Pardi & Papi, 1953). Even the so-called 'local optical factor', that is, differences in spectral composition between the sea and land hemidomes of the sky over the beach (Pardi and Papi, 1953, Ercolini et al., 1983), has recently been doubted (Ugolini et al., 2002). Nevertheless, many releases of sandhoppers in a confined environment (a transparent Plexiglas bowl with the view of the landscape screened out) clearly show the existence and use of some celestial cues in the orientation of *T. saltator*, even in experiments carried out very far from the sea and thus excluding the possible local optical factor (Pardi & Ercolini, 1986).

Without any intention of evaluating the possible perception and use of skylight polarization by *T. saltator*, we concentrated our investigation on the skylight intensity gradient as a potential compass orientation factor.

METHODS

We used adult individuals of *T. saltator* (Montagu) collected from a beach in the Natural Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli, Pisa, Italy (43°75'N, 10°30'E). The sea–land direction of the *Y* axis (perpendicular to the shoreline) is 264°–84°.

After their capture, the sandhoppers were transferred to the laboratory and kept in Plexiglas boxes containing wet sand at room temperature (25 °C) and with a variable artificial photoperiod corresponding in phase and duration to the natural one. Food (universal dried food for fish, SERA Vipan, Heisenberg, Germany) was constantly available.

The experiments were conducted in Florence (43°46'N, 11°15'E), from 0900 to 1000 hours, with the sun at 39° of zenithal distance. We also carried out releases at an equatorial latitude (Malindi, Kenya, 3°21'S, 40°11'E) at two different times of the morning, at 1000 and around midday, with the sun at different zenithal distances: 39° and 10°. The animals tested in Kenya were kept for 10 days prior to the experiments with a photoperiod in phase with the local one. Since sandhoppers released in groups do not show any interindividual influence on the directional choice (Scapini et al. 1981), we used groups of 5–10 individuals for each release. A single direction was recorded for each individual when the longitudinal axis of the body was oriented radially (ca. 45°), with the head facing away from the centre of the bowl. The trials were carried out between May and September 2004–2006 in Florence and in February 2006 in Kenya.

The experimental apparatus was similar to the one used by Pardi & Papi (1953), slightly modified (Ugolini & Macchi, 1988). For the controls the device consisted of a transparent Plexiglas bowl (height 5 cm, diameter 20 cm) set on a goniometer placed on a circular transparent Plexiglas plate (diameter 30 cm) set horizontally on a tripod. A white Plexiglas screen (height 5 cm, diameter 30 cm)

placed around the bowl blocked the view of the surrounding landscape but allowed a view of the sun and sky. For the experimental treatments, we used the same apparatus described previously but we placed a translucent (opaline), white-glaze Plexiglas dome (diameter 80 or 30 cm) over the bowl containing the animals, which prevented a view of the sun. Sandhoppers were dehydrated for a few minutes in a dry environment and then released in the Plexiglas bowl on a dry substratum.

We performed the following treatments: (1) tests with the translucent dome in natural conditions of the sun and sky (i.e. the dome was illuminated by the sun) to test the animals only in the presence of the skylight intensity pattern and the spectral gradient inside the dome; (2) tests with the translucent dome and the sun screened out by a vertical wooden screen (1×1 m) to test sandhoppers with a homogeneous condition of illumination; and (3) spectral filtering tests in natural conditions of the sun and sky with the translucent dome uniformly covered by a blue gelatin filter (Moonlight Blue no. 183, Spotlight, Milan, Italy) which greatly modified the translucent dome's spectral transmittance by excluding wavelengths higher than 560 nm (Fig. 1a), to exclude any spectral differences inside the dome.

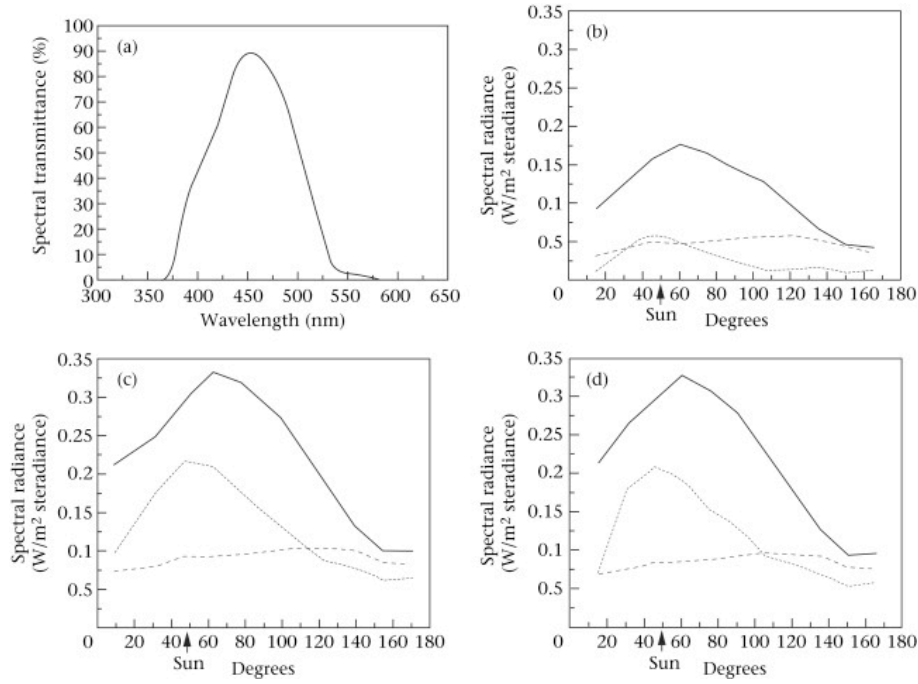


Figure 1. (a) Transmittance diagram of the blue gelatin filter used to cover the translucent dome. (b–d) Radiance measured inside the translucent dome under the sun at wavelengths of (b) 400, (c) 450 and (d) 500 nm. The X axis shows degrees from 0° to 165° along the solar meridian at which the measurements were taken. The black line shows measurements carried out in natural conditions of the sun and sky, the dotted line measurements carried out with the dome covered by the blue filter and the dashed line measurements carried out with the sun screened out. The black arrow indicates the height of the sun in the sky at the time of the measurements.

Characterization of the translucent dome

We measured the amount of light (radiance) inside the Plexiglas dome every 15° along the solar meridian (from 15° to 165°) with a spectroradiometer (Minolta, Osaka, Japan, mod. CS1000) placed in the centre of the dome. The radiometric measurements were carried out in Florence at three wavelengths (400, 450 and 500 nm) in natural conditions of the sun (45° of zenithal distance) and sky, with the sun screened out, and with the translucent dome covered by the blue filter (Fig. 1b–d). In natural conditions of the sun and sky, the intensity differences measured along the solar meridian inside the dome were comparable to those in the sky.

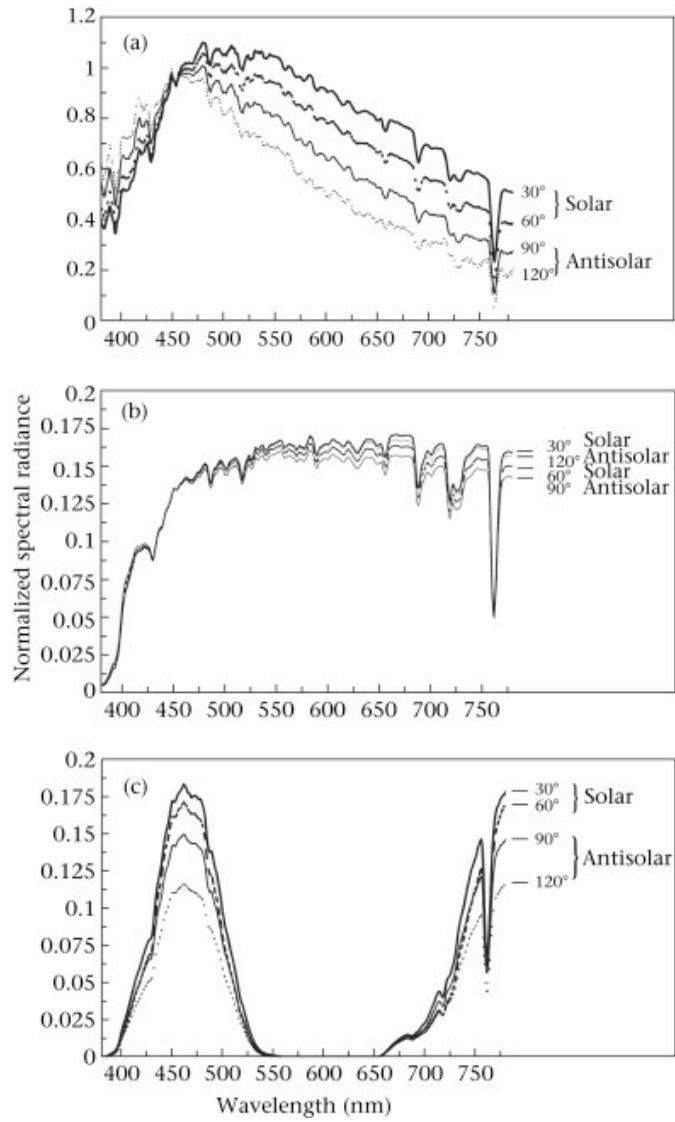


Figure 2 shows the results of three different spectral analyses: (1) the blue sky without the translucent dome (Fig. 2a), (2) the interior of the translucent dome in natural conditions of the sun and sky and (3) the interior of the translucent dome covered homogeneously by the blue gelatin filter in natural conditions of the sun and sky. All the measurements were made at four points along the solar meridian: 30°, 60°, 90° and 120° (Fig. 2b). The light spectrum differed between the natural sky and the interior of the translucent dome.

The radiance inside the translucent dome increased in the hemidome facing the solar hemicycle, with a maximum approximately 20° higher than the position of the sun in the sky, and progressively decreased in the hemidome facing the antisolar hemicycle. Similar conditions were obtained with the dome covered by the blue filter, although the radiance inside the translucent dome was greatly reduced and the maximum was closer to the zenith. When the sun was screened out, the radiance inside the dome was uniform and there were no significant directional asymmetries.

For the sky, the quantity of light in the green and red spectral bands was higher in the solar hemicycle (30°, 60° of elevation) than in the antisolar hemicycle (90°, 120°). Indeed, the ratio of the amount of light in the blue (380–480 nm), green (480–580 nm) and red (580–700 nm) spectral bands passed from 10:14:13 at 30° to 10:9:6 at 120°. This means that the spectrum was ‘flatter’ and the light whiter in the solar hemicycle than in the antisolar one, where it turned to blue.

For the interior of the translucent dome, in natural conditions of the sun and sky (Fig. 2b) the ratio of blue:green:red was almost the same at 30° and 120° (10:17:21 and 10:16:20, respectively), since the spectrum remained unaltered and flat in both the solar and antisolar hemicycles. With the blue filter, the ratio was again almost constant, while the spectrum shifted towards blue (Fig. 2c).

RESULTS AND DISCUSSION

Releases of adult individuals of *T. saltator* tested in Florence directly under the sun and blue sky (controls, Fig. 3a) showed a mean direction in agreement with the expected (seaward) direction. The same was true for animals tested under the sun with the translucent dome (Watson U^2 test: $U^2 = 0.082$, $N_1 = 30$, $N_2 = 84$, NS; Fig. 3a, b) even when the dome was covered by the blue filter ($U^2 = 0.181$, $N_1 = 30$, $N_2 = 72$, NS; Fig. 3a, c). Releases carried out under the dome with the sun screened out produced a uniform distribution (Fig. 3d).

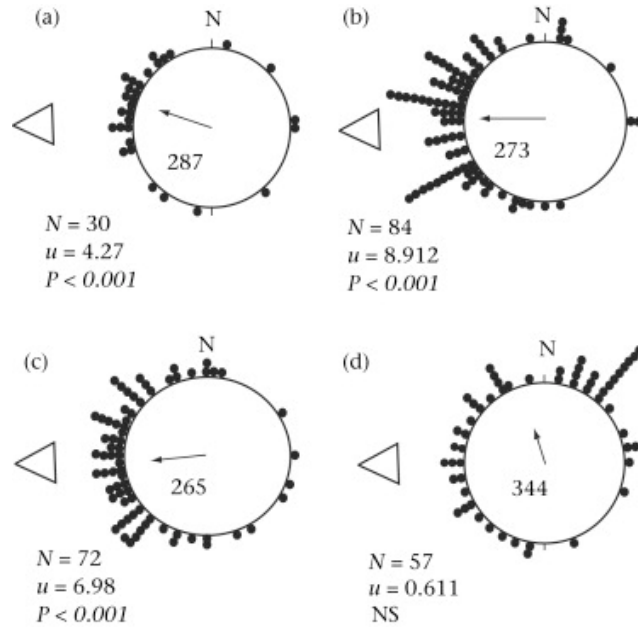


Figure 3. Orientation of sandhoppers released in Florence, Italy: solar zenithal distance = 39° . (a) Control with a view of the sun and sky only, (b) translucent dome, (c) translucent dome covered by the blue gelatin filter and (d) translucent dome with the sun screened out. The white triangle indicates the seaward direction; dots show the direction of movement of sandhoppers (one per dot); the black arrow shows the mean vector and angle (the length of the mean vector ranges from 0 to 1 = radius of the circle); u is the V test value.

Sandhoppers tested directly under the sun and blue sky in Malindi showed a good orientation towards the expected direction independently of the zenithal distance of the sun ($U^2 = 0.072$, $N_1 = 26$, $N_2 = 29$, NS; Fig. 4a, b). Under the translucent dome, the directional choice was still as predicted when the zenithal distance of the sun was 39° ($U^2 = 0.168$, $N_1 = 29$, $N_2 = 33$, NS; Fig. 4a, c), but was uniform when the zenithal distance was 10° (Fig. 4d).

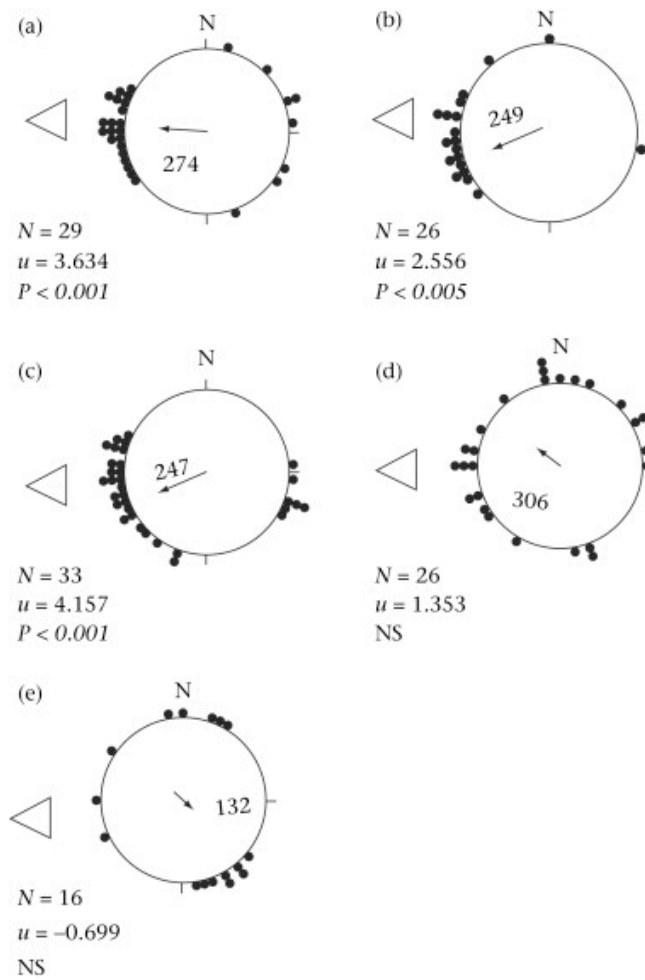


Figure 4. Orientation of sandhoppers released in Malindi, Kenya. (a) Control with a view of the sun and sky only, sun at 39° of solar zenithal distance, (b) control with a view of the sun and sky only, sun at 10° of solar zenithal distance, (c) translucent dome, sun at 39° of solar zenithal distance, (d) translucent dome, sun at 10° of solar zenithal distance and (e) translucent dome, with the sun screened out, sun at 39° of solar zenithal distance. For further information, see Fig. 3.

Sandhoppers released under the translucent dome with the sun at 39° of zenithal distance but screened out showed a uniform distribution (Fig. 4e); in fact, only 36% of the individuals (16/44) were able to orient correctly, whereas most of them turned around without heading in any direction.

Our findings clearly show that *T. saltator* used the skylight intensity gradient as a compass cue for ecologically correct direction finding. The difference between the distributions obtained inside the dome under the sun and with the sun screened out, both in the Florence and the Malindi experiments, strongly support this statement. Moreover, the experiment carried out when the sun was near its zenithal culmination (Malindi, Kenya) confirmed the importance of the skylight intensity gradient as a good reference cue. In fact, when the sun was near the zenith, the difference in intensity gradient between the solar and antisolar hemidomes was practically absent and the sandhoppers were dispersed, as in the releases carried out in Florence under the screened sun.

Measurements of the light transmitted through the dome with and without the blue filter demonstrated a substantial difference in radiance between the two hemidomes in both cases, while the spectral gradient was virtually eliminated by the filter. In fact, the gelatin filter screened out most of the green and red light and selected only the blue part of the spectrum (full width half maximum 404–506 nm) to which *T. saltator* is most sensitive (Ugolini et al., 1996). In this case, the shape of the spectra recorded along the sun meridian remained unaltered, while the total amount of light was higher in the solar hemidome than in the antisolar one. Therefore, although we cannot exclude the possibility that *T. saltator* uses the celestial spectral gradient in its direction finding, it is clear that this hypothetical cue was eliminated in our experiments.

In desert ants (*Cataglyphis*), the main compass cue is polarized skylight (Wehner & Müller, 2006). However, when the sun's disc is screened out and perception of sky polarization is prevented by spectral filtering (i.e. when the ants can perceive the spectral and intensity gradients), they are still able to maintain the correct homeward compass direction. They become merely photopositive when allowed to perceive only the skylight intensity gradient (Wehner, 1997).

Sandhoppers are neither homers nor central place foragers: they use a unidirectional, nonvectorial orientation to return to the belt of damp sand near the sea. Therefore, it would not be surprising if they use some celestial orientation cues that could allow a less precise directional choice than that used by other animals with different spatiotemporal problems to solve (see also Ugolini, 2003). In particular, the difference in skylight intensity could be used even when the sun is not visible.

In summary, our findings add a new celestial factor to the list of celestial orientation cues used by arthropods in their spatial orientation.

Acknowledgments

We thank Dr Jochen Zeil (The Australian National University, Canberra, Australia) for his critical reading of the manuscript. The research was funded by the Università di Firenze (local funds ex-60%) assigned to A.U.

REFERENCES

- E. Batschelet**, Circular Statistics in Biology, Academic Press, London (1981).
- R. Campan**, Tactic components in orientation. In: M. Lehrer, Editor, *Orientation and Communication in Arthropods*, Birkhäuser Verlag, Basel (1997), pp. 1–40.
- M.A.J.M. Coemans, H.J.J. Vos and J.F.W. Nuboer**, The relation between celestial colour gradients and the position of the sun, with regard to the sun compass, *Vision Research* **34** (1994), pp. 1461–1470.
- A. Ercolini, L. Pardi and F. Scapini**, An optical directional factor in the sky might improve the direction finding of sandhoppers on the seashore, *Monitore Zoologico Italiano* **17** (1983), pp. 313–327.
- G. Horvath and D. Varju**, Polarized Light in Animal Vision, Springer Verlag, New York (2004).
- L. Pardi and A. Ercolini**, Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans, *Bollettino di Zoologia* **53** (1986), pp. 139–160.
- L. Pardi and F. Papi**, Die Sonne als Kompass bei *Talitrus saltator*, *Naturwissenschaften* **39** (1952), pp. 262–263.
- L. Pardi and F. Papi**, Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* Montagu (Crustacea, Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico, *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* **35** (1953), pp. 459–489.
- F. Scapini, A. Ugolini and L. Pardi**, Analysis of astronomical orientation in littoral Amphipods using individual and group tests (Crustacea, Amphipoda), *Monitore Zoologico Italiano (Nuova Serie)* **15** (1981), pp. 77–86.
- A. Ugolini**, Activity rhythms and orientation in sandhoppers (Crustacea, Amphipoda), *Frontiers in Bioscience* **8** (2003), pp. 722–732.
- A. Ugolini and T. Macchi**, Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae), *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **121** (1988), pp. 79–87.
- A. Ugolini, B. Vignali, C. Castellini and M. Lindström**, Zonal orientation and spectral filtering in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae), *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.* **76** (1996), pp. 377–389.
- A. Ugolini, L. Meucci, B. Tiribilli and M. Lindström**, The local optical factor as an orientation cue for the sandhopper *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda, Talitridae), *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* **35** (2002), pp. 27–36.
- A. Ugolini, S. Somigli, V. Pasquali and P. Renzi**, Locomotor activity rhythm and sun compass orientation in the sandhopper *Talitrus saltator* are related, *Journal of Comparative Physiology A* **193** (2007), pp. 1259–1263.
- F.J. Verheijen**, Orientation based on directivity, a directional parameter of the animal's radiant environment. (Ed. By K. Schmidt-Koenig and W.T.

- Keeton). *Animal Migration, Navigation, and Homing*, Springer, Berlin (1978), pp. 447–458.
- R. Wehner**, The ant's celestial compass system: spectral and polarization channels. In: M. Lehrer, Editor, *Orientation and Communication in Arthropods*, Birkhäuser Verlag, Basel (1997), pp. 145–185.
- R. Wehner and M. Müller**, The significance of directional sunlight and polarized skylight in the ant's celestial system of navigation, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **103** (2006), pp. 12575–12579.

CAPITOLO 5

SENSIBILITA' SPETTRALE E SPECIALIZZAZIONE REGIONALE DEI PIGMENTI VISIVI IN *T.SALTATOR*: INDAGINI COMPORTAMENTALI

Nota: Gli esperimenti descritti in questo capitolo sono stati effettuati in collaborazione con il Dott. Luca Mercatelli (INOA), la Dott.ssa Emma Ristori e la Dott.ssa Martina Cerboni.

INTRODUZIONE

L'anfipode sopralitorale *Talitrus saltator* è considerato sin dagli anni '50 un buon modello biologico per gli studi di orientamento. E' stato ampiamente dimostrato che il meccanismo di recupero zonale in questi organismi si basa prevalentemente su stimoli visivi, ed in particolare rivestono un ruolo determinante i fattori di natura astronomica quali il sole (Pardi & Papi, 1952, 1953; Pardi & Grassi, 1955; Pardi, 1960) e la luna (Papi & Pardi, 1953; Ugolini et al, 1999). Nel corso degli anni è stato inoltre più volte ipotizzato che questi animali fossero in grado di percepire ed utilizzare fattori orientanti celesti quali il pattern di polarizzazione ed il gradiente spettrale (Papi and Pardi, 1952, Pardi and Papi, 1953, Ugolini *et al.*, 1993, 1996, 2004), questo genere di fattori rivestirebbe un ruolo importante nell'orientamento di questa specie quando la visione diretta del sole non è disponibile.

Esperimenti di filtraggio spettrale hanno messo in evidenza che *T. saltator* sembra percepire uno stimolo importante nella banda luminosa dell'UV (Ugolini *et al.*, 1993, 1996).

Inoltre è stato recentemente dimostrato che la luce con lunghezza d'onda nel blu e nel verde (450 e 550 nm rispettivamente) ha un importante significato ecologico per questa specie, infatti un paesaggio artificiale che simula il blu del mare e il verde della macchia mediterranea (caratteristici dell'habitat dove i talitri vivono) influenza la scelta direzionale degli individui (Ugolini et al., 2006).

Indagini preliminari basate sulla risposta foto tattica a luci monocromatiche di uguale intensità (Ercolini e Scapini, 1976) misero in evidenza una generale preferenza in *T. saltator* per luce con lunghezza d'onda corta (circa 450 nm); tale risultato fu inoltre confermato da registrazioni elettrofisiologiche che mostrarono una sensibilità nei talitri per la luce blu (Mezzetti et al., 1997, Ugolini et al., 1996).

I risultati da noi ottenuti (Ugolini et al., 2009), mostrati nel capitolo 2 di questa Tesi, hanno messo in luce sia attraverso indagini elettrofisiologiche che comportamentali due diversi picchi di sensibilità spettrale in questa specie: uno tra 390 e 450 nm e l'altro tra 500 e 550 nm, dimostrando per la prima volta in modo diretto la percezione nei talitri della luce UV.

La presenza dei due picchi di sensibilità spettrale permette di ipotizzare la presenza di almeno due classi di recettori nell'occhio dei talitri, una per le lunghezze d'onda corte e una per le lunghezze d'onda lunghe. Tuttavia non è nota la loro distribuzione nell'occhio. Studi condotti su *Apis mellifera* (Wehner e Strasser, 1985), *Gryllus campestris* (Labhart et al., 1984), *Cataglyphis bicolor* (Duelli e Wehner, 1973; Wehner, 1992) hanno individuato infatti una specializzazione spaziale dei pigmenti visivi negli occhi di questi animali, dove la regione dorsale dell'occhio presenta i recettori adibiti alla percezione della luce Blu ed UV (responsabili della percezione della luce polarizzata), mentre i recettori per la luce con lunghezza d'onda maggiore si

trovano nella regione ventrale. Pertanto nel presente lavoro è indagata la possibile regionalizzazione dei pigmenti visivi nell'occhio di *T. saltator* attraverso indagini di tipo comportamentale.

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati effettuati su esemplari adulti di *Talitrus saltator* (Anfipodae, Talitridae). Gli individui adulti e subadulti sono stati raccolti sulla spiaggia presso la Foce del Fiume Morto Vecchio (Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli, Pisa). Dopo la cattura gli esemplari sono stati trasportati in laboratorio dove sono stati posti in vaschette di plexiglass (14x24 cm), coperte da una lastra di vetro per impedire la fuga degli animali, contenenti sabbia mantenuta costantemente areata e umidificata con acqua di mare. La stanza era mantenuta in condizioni di temperatura e l'illuminazione era generata da lampade al neon collegate ad un timer che ne regolava l'accensione e lo spegnimento secondo un ritmo L:D corrispondente per fase e durata a quello naturale.

APPARATO SPERIMENTALE

Saggi di filtraggio spettrale

Per gli esperimenti di controllo abbiamo utilizzato un apparato sperimentale simile a quello già impiegato da Pardi e Papi (1953) e successivamente modificato da Ugolini e Macchi (1988) (Fig. 1A, B), costituito da un treppiede in alluminio di altezza regolabile su cui poggia un disco di plexiglass trasparente ($\varnothing=30$ cm) fornito di goniometro il cui 0° viene fatto coincidere con il Nord magnetico. Sul disco è posta una ciotola di plexiglass trasparente, munita di coperchio di acetato trasparente per evitare la fuga degli animali (Fig. 2). In alcuni saggi al posto del foglio di acetato è stato utilizzato come coperchio una rete metallica (Fig. 3). Esternamente alla ciotola è inserito uno schermo circolare di plexiglass bianco ($h=5$ cm; $\varnothing=30$ cm) che permette la visione del cielo e del sole, ma impedisce agli animali di vedere il paesaggio circostante. Gli esperimenti sono stati condotti lontano dal mare, a Firenze presso il Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, tra le ore 10 e le ore 11 in condizioni di cielo sereno o poco nuvoloso.

Le direzioni assunte dagli individui sono state rilevate ponendo una videocamera sotto al disco trasparente e filmando l'intero esperimento. Da ciascun filmato è stato possibile rilevare la direzione di ogni individuo "radiale" ($\pm 2.5^\circ$) e il numero degli individui "non radiali".

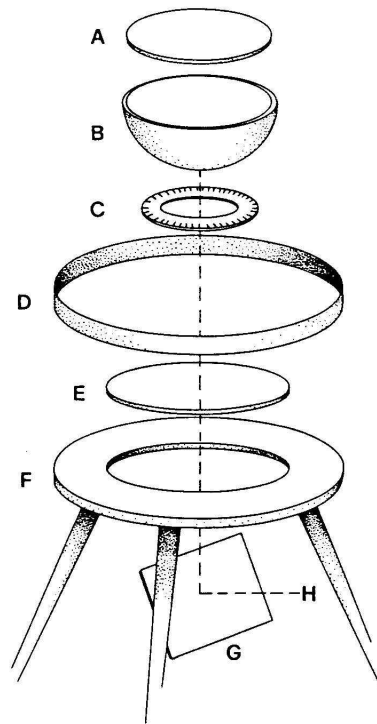


Fig.1A Apparato sperimentale usato per i saggi. A: coperchio di acetato o rete metallica; B: ciotola di plexiglas; C: goniometro; D: schermo di plexiglas bianco; E: disco di plexiglas trasparente; F: Treppiede di alluminio; G: specchio; H: osservatore.



Fig.1B Apparato sperimentale usato per i saggi.

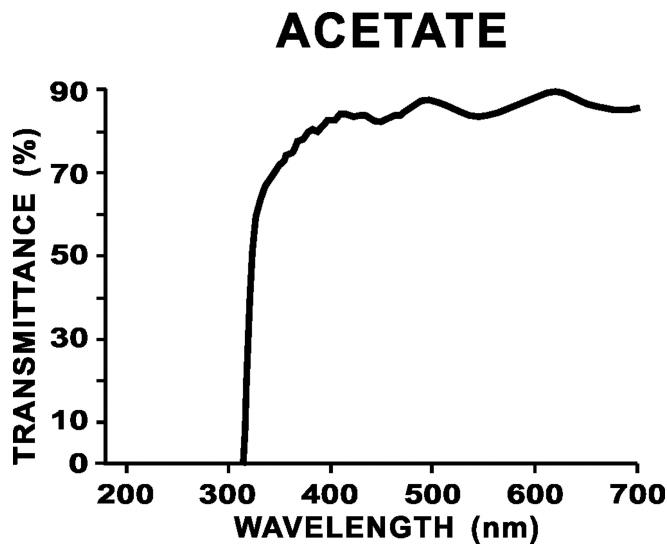


Fig.2 Trasmittanza del coperchio di acetato trasparente usato nei saggi.

Negli esperimenti di filtraggio spettrale gli animali sono stati saggiati in presenza di filtri in gelatina (Spotlight, Milano) che modificavano la radiazione elettromagnetica incidente, posti sulla vaschetta di plexiglass contenente gli animali. I filtri utilizzati sono stati:

- Filtro verde, in gelatina, che seleziona lunghezze d'onda con un picco massimo di 546 nm.
- Filtro blu, in gelatina, che ha un picco massimo a 456 nm.

La trasmittività dei filtri (Fig.4) è stata misurata con uno spettrofotometro (Perkin-Elmer $\lambda 900$).

Abbiamo saggiato tre gruppi di animali, sia in condizioni di sole visibile, che in condizioni di sole schermato :

- Controlli, con occhi non colorati
- Sperimentali, con parte dorsale dell'occhio oscurata.
- Sperimentali, con parte ventrale dell'occhio oscurata.

Gli occhi degli animali sono stati colorati utilizzando smalto da modellismo nero opaco (Umbro, Enamel).

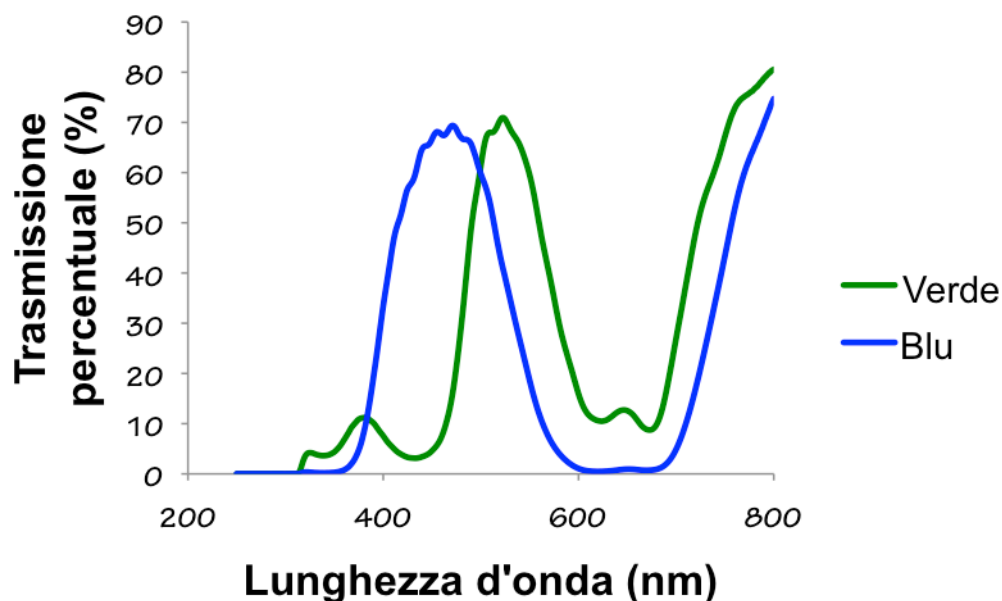


Fig.4 Curva di trasmittanza dei filtri blu e verde. Come possiamo osservare il filtro blu presenta un range di trasmissione tra 320 e 600 nm, con un massimo a 450 nm; il filtro verde presenta invece un picco a 540 nm.

Saggi di scelta binaria

L'apparato sperimentale utilizzato in questi saggi era costituito da un tubo di plexiglas (lunghezza= 60 cm, diametro= 4,5 cm), che poggiava su 4 supporti. Un foro centrale, praticato superiormente, nel quale veniva inserito perpendicolarmente un tubo più piccolo che permetteva l'introduzione degli animali all'interno dell'apparato sperimentale (Fig.5). Alle due estremità del corridoio erano presenti due contenitori di vetro collocati sotto le due aperture basali presenti nei tratti finali del corridoio. La sorgente luminosa era costituita da una lampada Xenon (150W) collocata ad un'estremità del corridoio. La luce emessa dalla lampada veniva opportunamente scissa e deviata da un sistema di specchi, permettendo così l'ingresso di due fasci luminosi alle due estremità opposte del corridoio. In questo modo veniva consentita la scelta binaria degli animali sottoposti contemporaneamente a due lunghezze d'onda diverse (Fig.6). Alle due estremità del corridoio venivano posti, in appositi supporti, dei filtri ad interferenza (filtri Schott) in modo che la luce in entrata fosse composta solo dalle lunghezze d'onda scelte per gli esperimenti. Le lunghezze d'onda utilizzate nel corso dei saggi sono: blu (456 nm) e verde (546 nm). La trasmittanza dei filtri è stata opportunamente misurata utilizzando uno

spettrofotometro (Perkin-Elmer, modello Lambda 900). Veniva inoltre misurata, utilizzando un radiometro portatile (Ophir, modello NOVA, con testa di misura PD300UV), l'intensità luminosa dei due fasci in ingresso, in modo da rilevare eventuali differenze di radianza tra i due, che venivano eliminate utilizzando dei filtri neutri attenuatori.

Gli esperimenti sono stati effettuati durante la mattina dalle 9:00 alle 13:00 presso i laboratori dell'INOA (CNR) di Firenze. Per ogni saggio venivano impiegati circa 10 individui. Una volta posti al centro del corridoio gli animali venivano mantenuti, al buio o in presenza delle due luci, per circa 20 minuti, tempo necessario affinché gli occhi dei talitri potessero essere considerati "DARK ADAPTED" o "LIGHT ADAPTED". Successivamente gli animali venivano rilasciati e veniva permesso loro (per 2 minuti) di effettuare la scelta direzionale verso una delle due estremità. Alla fine del saggio venivano contati gli animali presenti nei contenitori di raccolta posti ai due lati del corridoio.

Abbiamo saggiato al risposta fototattica dei talitri per le due lunghezze d'onda (Blu e Verde) in funzione dell'intensità luminosa. Le diverse lunghezze d'onda sono state infatti utilizzate alla massima intensità luminosa, e a valori d'intensità inferiori, raggiunti con l'applicazione di filtri attenuatori (Tab. 1).

Gli animali in questo caso effettuavano una scelta tra la sorgente di luce monocromatica e l'oscurità.

lunghezza d'onda (λ)	livello Intensità	Intensità (μW/cm ²)
BLU (436 nm)	piena potenza	30-31
	70%	22
	50%	16-17
	45%	14,5
	22%	5,5
VERDE (546 nm)	piena potenza	53
	60%	32
	25%	14
	10%	6

Tab. 1 Valori d'intensità registrati per ogni lunghezza d'onda

Abbiamo inoltre effettuato i seguenti saggi di scelta binaria:

- Blu vs Verde con animali Dark Adapted
- Blu vs Verde con animali con occhi adattati a luce monocromatica

(Blu e Verde)

Per eliminare errori sperimentali nel set-up strumentale nella valutazione della scelta binaria gli esperimenti sono stati svolti sia con i filtri posti all'estremità più luminosa, quella dalla parte della lampada, che all'estremità opposta.

Analisi statistica

I dati ottenuti nei saggi di filtraggio spettrale sono stati elaborati seguendo l'analisi statistica proposta da Batschelet (1981) per le distribuzioni circolari. Per ogni distribuzione sono stati calcolati l'angolo medio di orientamento α (compreso tra 0° e 359°) e la lunghezza del vettore mediorisultante r (compreso tra 0 e 1). Il valore del vettore r ci fornisce un'indicazione sulla dispersione degli animali intorno alla direzione media α , ovvero la direzione attesa: se il valore di r si avvicina ad 1 allora gli animali saranno concentrati intorno alla direzione media, se, al contrario, r tende a 0 la distribuzione è dispersa. Per verificare se la distribuzione differisce in modo significativo da una distribuzione uniforme, è stato adottato il V test. Per ogni distribuzione sono stati poi costruiti degli istogrammi relativi alla percentuale di individui "non radiali".

Le distribuzioni di frequenza sono state analizzate con il G-Test. Nei casi in cui questo test non era applicabile abbiamo utilizzato il Binomial test.

RISULTATI

Saggi di filtraggio spettrale

Nei saggi di controllo gli animali si dirigono verso la direzione attesa in modo statisticamente significativo, sia in condizioni di sole visibile (Fig.5 A), sia in condizioni di sole schermato (Fig.5 B). Nelle distribuzioni ottenute con il filtro verde sembra ridursi la capacità di orientamento degli individui saggiati (Fig.5 C, D). Sia con sole visibile che con sole schermato infatti il basso numero di animali riportato nelle distribuzioni è dovuto ad un'alta percentuale (più del 90%) di individui non radiali presente durante i saggi (Tab.2). In presenza del filtro blu gli animali si dirigono verso la direzione attesa in modo statisticamente significativo sia con sole visibile (Fig.5 E) che schermato (Fig.5 F). Anche in questi saggi tuttavia è stata registrata una significativa percentuale di animali non radiali (Tab.2).

In figura 6 sono riportate le distribuzioni dei saggi effettuati sugli individui con la metà ventrale degli occhi dipinti. In condizioni di cielo naturale, con sole visibile (Fig.6 A), osserviamo che gli individui si dirigono verso la direzione attesa in modo statisticamente significativo. Con sole schermato (Fig.6 B) la distribuzione è ai limiti della significatività. Anche con filtro verde e sole visibile (Fig.6 C) gli animali risultano dispersi. Nei saggi con il filtro blu gli animali si concentrano significativamente intorno alla direzione attesa sia con sole non schermato (Fig.6 D) che con sole schermato (Fig.6 E). Anche per questi saggi è riportato il numero di animali non radiali (Tab.3).

I saggi con gli animali con la parte dorsale degli occhi dipinta non hanno prodotto distribuzioni significative, gli individui mostravano infatti una quasi totale incapacità ad orientarsi verso una qualsiasi direzione. Pertanto abbiamo ritenuto opportuno riportare in figura 7 il grafico riguardante la percentuale di individui non radiali

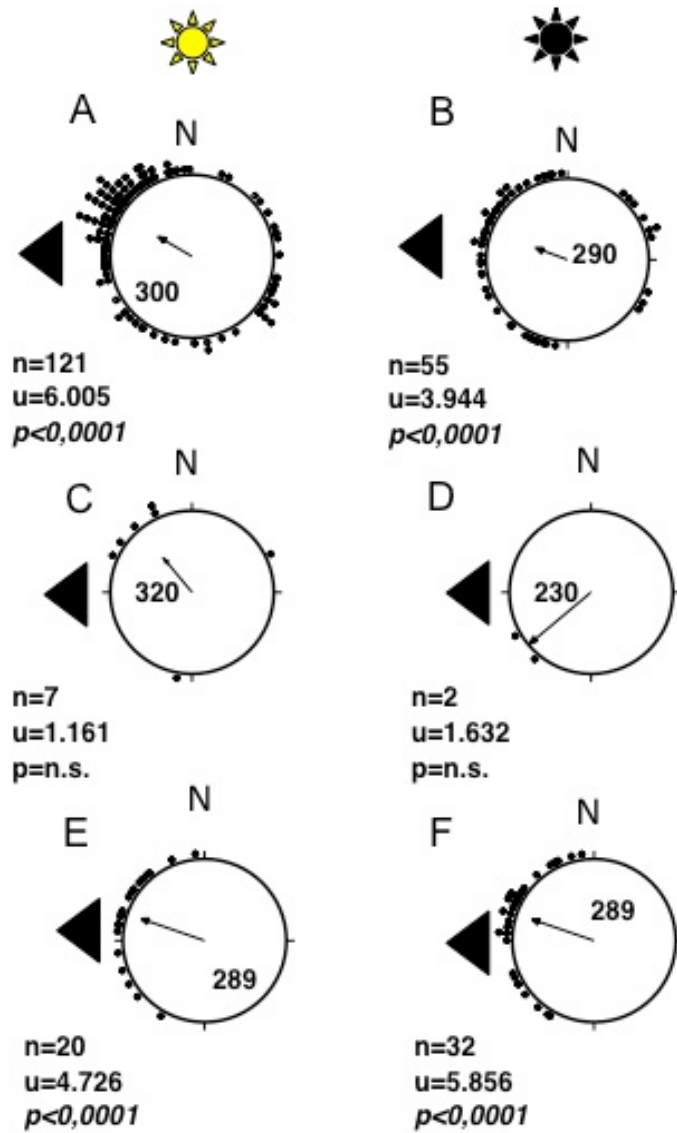


Fig.5 Saggi di filtraggio spettrale, animali con occhi non dipinti. **A:** controlli, sole visibile; **B:**controlli, sole schermato; **C:** filtro verde, sole visibile; **D:** filtro verde, sole schermato; **E,** filtro blu,sole visibile; **F,** filtro blu, sole schermato **n**, numero di animali saggiati; **u**, valore del V test con livello di probabilità **p**. Ogni pallino nero corrisponde alla direzione assunta da un singolo individuo. Triangolo nero, DTF attesa per l'orientamento solare.

N non radiali/N totale	SOLE VISIBILE n	SOLE SCHERMATO n
CONTROLLI	5/126 (3%)	6/61 (10%)
FILTRO VERDE	28/35 (80%)	33/35 (94%)
FILTRO BLU	15/35 (43%)	3/35 (8%)

Tab. 2 Animali con occhi non dipinti. Numero di animali non radiali registrati durante i saggi sul numero totale di individui saggiati, tra parentesi è riportata la percentuale di animali non radiali.

N non radiali/N totale	SOLE VISIBILE n	SOLE SCHERMATO n
CONTROLLI	22/30 (73%)	21/30 (70%)
FILTRO VERDE	23/30 (76%)	
FILTRO BLU	14/30 (46%)	22/30 (73%)

Tab.3 Animali con la regione ventrale degli occhi oscurata. Numero di animali non radiali registrati durante i saggi sul numero totale di individui saggiati, , tra parentesi è riportata la percentuale di animali non radiali.

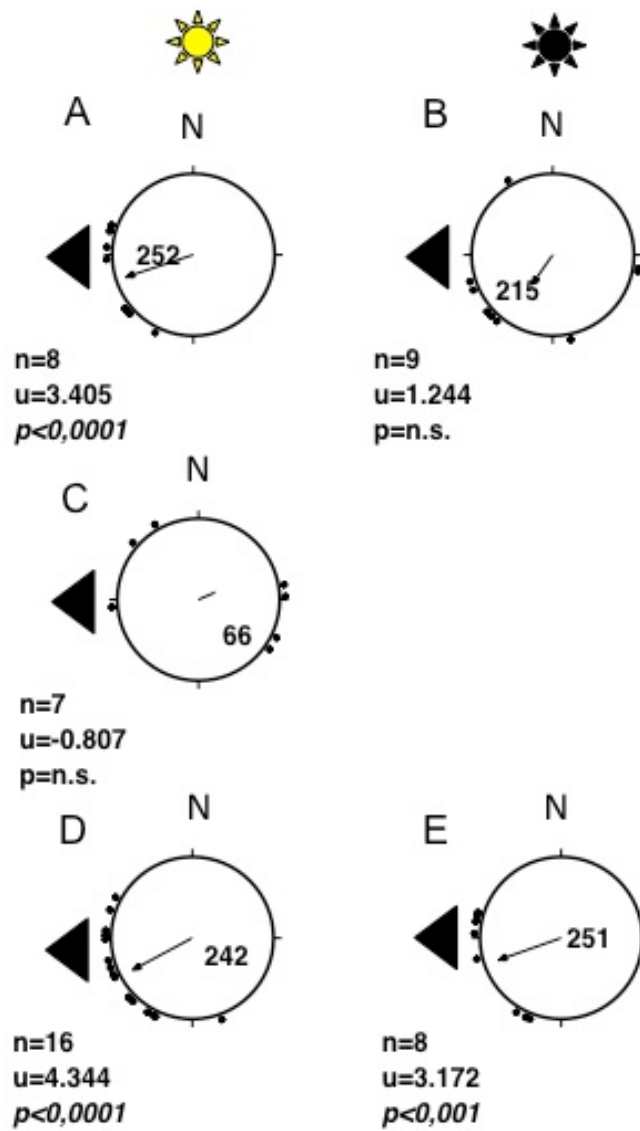
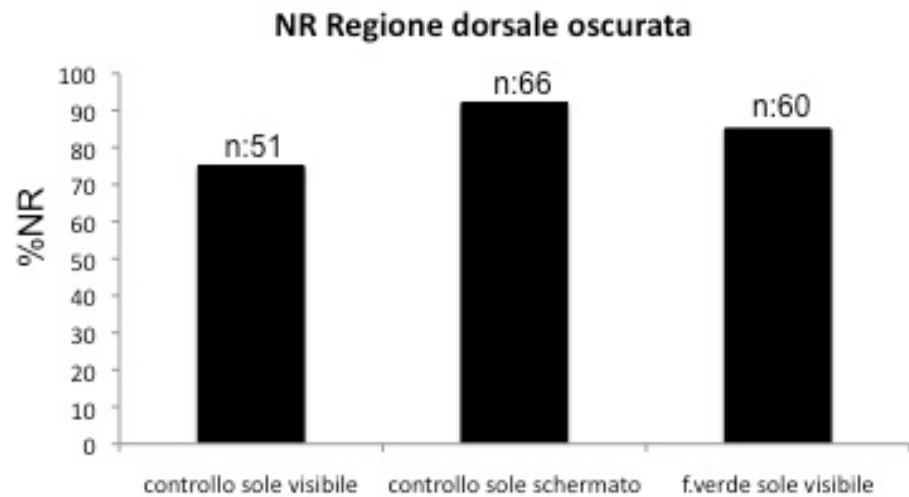
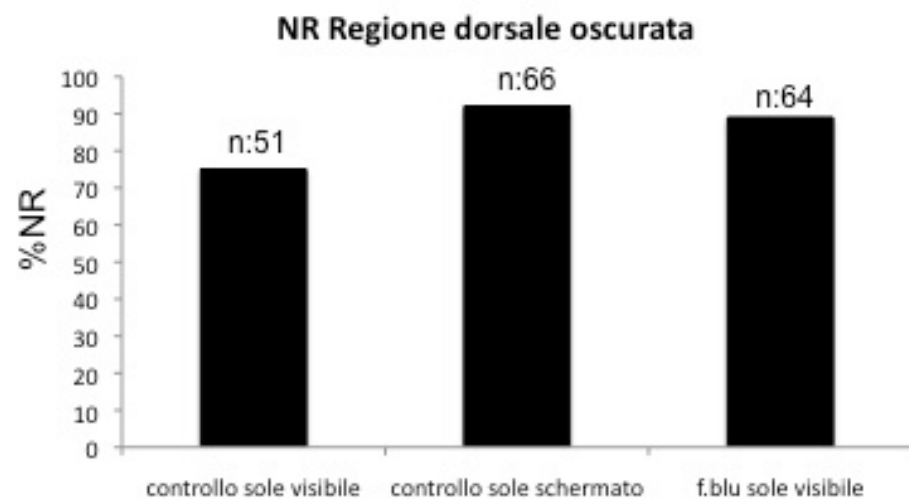


Fig.6 Saggi di filtraggio spettrale, animali con regione ventrale dipinta. **A**: controlli, sole visibile; **B**:controlli, sole schermato; **C**: filtro verde, sole visibile; **D**, filtro blu,sole visibile; **E**, filtro blu, sole schermato. **n**, numero di animali saggiati; **u**, valore del V test con livello di probabilità **p**. Per ulteriori spiegazioni si veda figura 5.



Gtest, $G = 1,817$, $df=1$, $P=N.S.$



Gtest, $G = 3,393$, $df=1$, $P=N.S.$

Fig.7 Percentuale individui non radiali e relativo G test, A, animali con la parte dorsale degli occhi dipinta saggiati con filtro verde, B, animali con la parte dorsale degli occhi dipinta saggiati con filtro blu. n, numero di animali non radiali registrati nei saggi. Il totale degli animali saggiati era di 70 individui per condizione sperimentale.

Saggi di scelta binaria

Negli esperimenti di scelta binaria fra blu e verde con adattamento al buio (Fig.8A), le frequenze di distribuzione degli animali risultano statisticamente significative (G test = 31,510, df = 2, $P < 0,001$), mentre nei saggi con adattamento ad entrambe le luci monocromatiche (blu 436 nm, verde 546 nm), nonostante il risultato del Gtest ottenuto confrontando i risultati delle tre scelte (Blu, Verde, centro) risulti significativo (G test = 49,024, df = 2, $P < 0,001$), è possibile osservare come gli individui scelgono in uguale misura di dirigersi verso le due sorgenti di luce blu e verde (G test scelta Blu vs Verde G:0,137, df=1, $P = \text{N.S.}$) (Fig.8B).

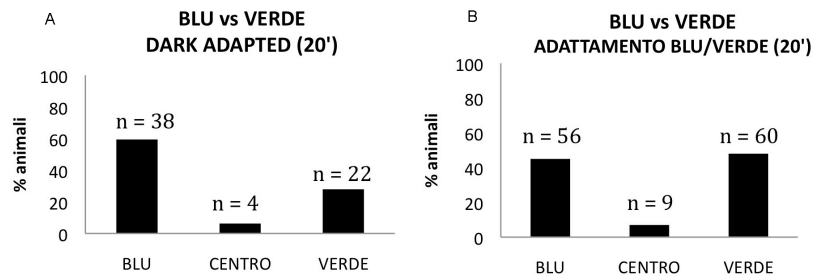


Fig.8 Frequenze rilevate negli esperimenti di scelta binaria condotti fra luce blu (436 nm) e verde (546 nm) con adattamento al buio(A), e con adattamento alle due luci monocromatiche (B).

La variazione della fotopositività di *T. saltator*, rispetto a lunghezze d'onda a 436 nm e a 546 nm, è stata saggiata con esperimenti di scelta binaria, a diversi valori d'intensità luminosa. Le figure 9 e 10 mostrano l'andamento della curva di fotopositività degli animali rispetto alle differenti intensità di luce blu e verde utilizzate, nella scelta fra le due sorgenti monocromatiche e l'oscurità.

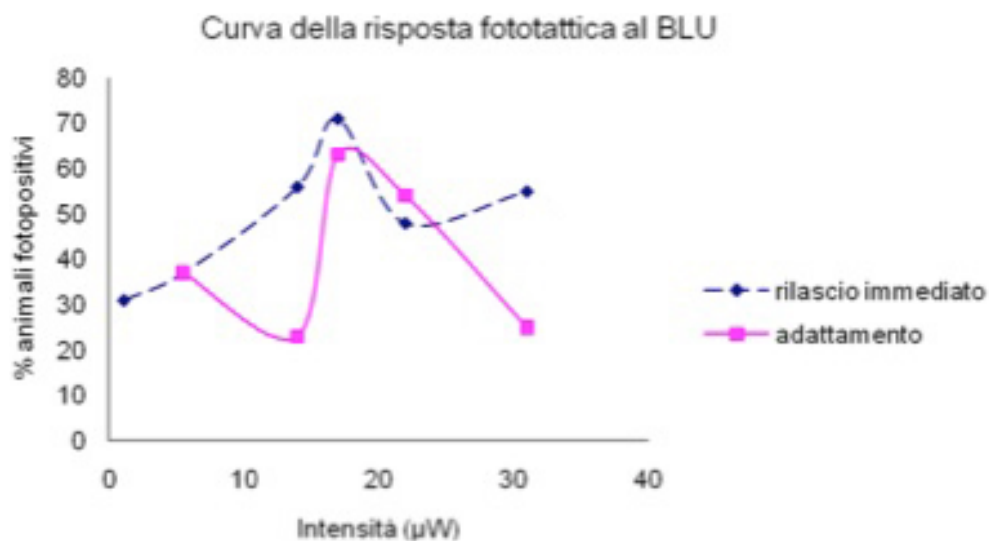


Fig. 9 Il grafico mostra la risposta fotopositiva al blu (espressa in percentuale sul totale d'individui rilasciati con adattamento al buio n= 130 e con rilascio immediato n= 138).

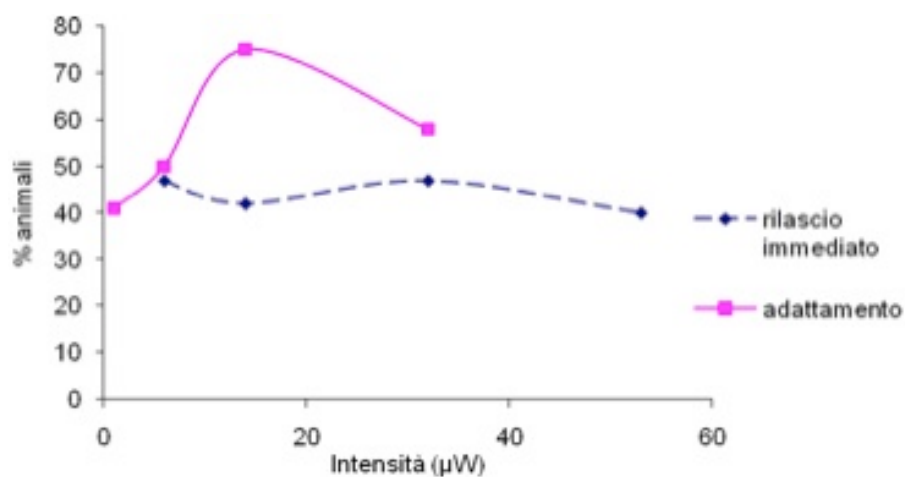


Fig.10 Il grafico mostra la risposta fotopositiva al verde (espressa in percentuale sul totale di individui rilasciati con adattamento n= 97 e con rilascio immediato n= 131).

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Ricerche condotte su api (Wehner e Strasser, 1985) e formiche (Wehner, 1981, Fent e Wehner, 1985), ma anche su altre specie di crostacei (Waterman e Horsch, 1966), hanno permesso d'individuare una disposizione spaziale specializzata dei pigmenti visivi negli occhi di questi animali. *Cataglyphis bicolor*, una specie di formica deserticola, presenta nella metà dorsale degli occhi una maggior concentrazione di recettori per l'assorbimento della radiazione a lunghezza d'onda più corta (UV e blu), mentre la metà ventrale risulta possedere recettori per lunghezze d'onda più lunghe (Wehner, 1997).

Nei saggi di filtraggio spettrale da noi effettuati su talitri con la metà ventrale o la dorsale degli occhi oscurata, abbiamo indagato circa una possibile regionalizzazione dei pigmenti visivi e la presenza di un'area preposta alla percezione degli stimoli di natura celeste. Saggiando con i diversi filtri i gruppi di animali con la metà inferiore degli occhi dipinta osserviamo che questi si orientano normalmente: le distribuzioni sono infatti confrontabili con quelle ottenute saggiando animali con occhi non dipinti. In presenza del filtro blu, questi si dirigono verso la direzione attesa, sia con sole visibile, che schermato. In presenza del filtro verde appaiono dispersi, così come avviene nei saggi con animali con occhio non dipinto. I gruppi di animali a cui è stata oscurata la parte dorsale degli occhi, mostrano invece una totale incapacità ad orientarsi, risultando non radiali nella maggior parte dei saggi. Questi risultati avvalorano l'ipotesi della presenza in *T. saltator* di una regione dell'occhio, in particolare la porzione dorsale, in cui sono localizzati recettori sensibili alla luce con lunghezza d'onda corta capaci di percepire fattori orientanti di natura celeste. Per analizzare in modo più approfondito le caratteristiche di questa regione dell'occhio e dei pigmenti visivi presenti sono necessarie ulteriori analisi di carattere elettrofisiologico. È importante sottolineare che il campo visivo di *T. saltator*, pur coinvolgendo maggiormente la parte dorsale e laterale degli occhi, comprende in parte anche la metà ventrale (Beugnon et al., 1986), che pur non presentando sensibilità per gli stimoli celesti, partecipa anch'essa alla visione del cielo. NR con disturbo aspecifico.

Gli esperimenti di scelta binaria hanno confermato la capacità, in *T. saltator*, di percepire la luce blu e verde (Mezzetti e Scapini, 1995; Ugolini et al., 1996, 2006), ed hanno inoltre mostrato l'andamento della risposta fototattica nei confronti dell'intensità luminosa per queste due lunghezze d'onda. I risultati ottenuti nelle prove con luce blu, mostrano una fotopositività, degli animali, maggiore nei confronti di valori d'intensità della radiazione intorno ai 17 μW : con questa intensità, il 60-70% degli individui saggiati si è diretto verso la luce blu, sia quando gli animali sono stati rilasciati immediatamente, sia dopo essere stati sottoposti ad un periodo di adattamento al buio. La curva della risposta fototattica alla luce verde indica, invece, una maggiore risposta fotopositiva per intensità intorno a 14 μW , anche in questo caso per il 70% degli animali. Il

picco di fotopositività per il verde è individuabile solo negli animali adattati al buio. Riguardo alla scelta binaria fra luce blu e verde, gli animali si sono diretti maggiormente verso la sorgente luminosa blu se sottoposti ad un periodo di adattamento all'oscurità. Questi risultati confermano l'elevata sensibilità nei confronti di lunghezze d'onda intorno ai 450 nm, già rilevata precedentemente (Ercolini e Scapini, 1976; Mezzetti et al., 1997; Ugolini et al., 1996, 2006), e potrebbero far ipotizzare il possibile impiego della visione del blu, come fattore orientante negli spostamenti lungo l'asse Y (Ugolini et al., 2006). I saggi effettuati dopo un periodo di adattamento a luce monocromatica, sia blu che verde, mostrano una distribuzione omogenea degli animali, rispetto alle due lunghezze d'onda. Tale risultato potrebbe esser dovuto all'inibizione della sensibilità dei pigmenti per l'assorbimento delle lunghezze d'onda nel blu, proprio in seguito all'adattamento in presenza di tale lunghezza d'onda.

L'assenza di una preferenza verso la sorgente luminosa blu o verde emersa dai saggi di scelta binaria ha messo in evidenza che, mentre in esperimenti di orientamento solare la presenza di un emiciclo blu e di un emiciclo verde, influisce sulla scelta direzionale degli individui assumendo un chiaro significato ecologico per gli stessi (e.g. blu direzione del mare, verde direzione della terra) (Ugolini et al., 2006), nell'ambito dei saggi da noi effettuati la presenza contemporanea delle due sorgenti monocromatiche non evoca chiare ed univoche preferenze per l'una o per l'altra.

BIBLIOGRAFIA

- Batschelet E.** 1981. Circular statistic in biology. Academic Press, London.
- Duelli P. & Wehner R.** 1973. The spectral sensitivity of polarized light orientation in *Cataglyphis bicolor* (Formicidae, Hymenoptera) *J. Comp. Physiol.*, **86**, 37-53.
- Ercolini A. & Scapini F.** 1976. Sensitivity and response to light in the laboratory of the littoral Amphipods *Talitrus saltator* Montagu *Monit. Zool. Ital.* (N. S.), **10**, 293-309.
- Fent K. & Wehner R.** 1985 Ocelli: A Celestial Compass in the Desert Ant *Cataglyphis*. *Science* **228**, 192-194.
- Labhart T., Hodel B. & Valenzuela I.** 1984. The physiology of the cricket's compound eye with particular reference to the anatomically specialized dorsal rim area. *J. Comp. Physiol. A*, **155**, 289-296.
- Mezzetti M. C. & Scapini F.** 1995 Aspects of spectral sensitivity in *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea - Amphipoda). *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* **26**, 35-45.
- Mezzetti M. C., Nardi M. & Scapini F.** 1997. Variation and ontogeny of the response to visual stimuli in Mediterranean populations of *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea-Amphipoda) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **211**, 129-142.
- Pardi L.** 1960. Innate components in the solar orientation of littoral amphipods *Cold. Spring. Harbor. Symp. Quant. Biol.*, **25**, 395-401.
- Pardi L. & Grassi M.** 1955. Experimental modifications of direction-finding in *Talitrus saltator* (Montagu) and *Talorchestia deshayesi* (Aud.) (Crustacea-Amphipoda). *Experientia*, **11**, 202-210.
- Pardi L. & Papi F.** 1952. Die Sonne als kompass bei *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea – Amphipoda). *Naturwissenschaften*, **39**, 262-263.
- Pardi L. & Papi F.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico *Z. Vergl. Physiol.*, **35**, 459-489.
- Ugolini A. & Macchi T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *Talitrus saltator* Montagu (Amphipoda: Talitridae) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **121**, 79-87.
- Ugolini A., Castellini C. & Tiribilli B.** 2004. The orientation of the sandhopper *Talitrus saltator* during a partial solar eclipse *J. Comp. Physiol. A*, **190**, 855-859.
- Ugolini A., Galanti G. & Mercatelli L.** 2009. Difference in skylight intensity is a new celestial cue for sandhopper orientation (Amphipoda, Talitridae) *Anim. Behav.*, **77**, 171-175.
- Ugolini A., Laffort B., Castellini C. & Beugnon G.** 1993. Celestial orientation and ultraviolet perception in *Talitrus saltator* *Ethol. Ecol. and Evol.*, **5**, 489-499.

- Ugolini, A., Melis, C. & Innocenti, R.** 1999a. Moon orientation in adult and young sandhoppers. *J. Comp. Physiol. A*, **184**, 9-12.
- Ugolini A., Somigli S., & Mercatelli L.** 2006. Green land and blu sea: a coloured landscape in the orientation of the sandhoppers *Talitrus saltator* (Montagu) (Amphipoda, Talitridae). *J. Exp. Biol.*, **209**, 2509-2514.
- Ugolini A., Vignali B., Castellini C. & Lindström M.** 1996. Zonal orientation and spectral filtering in *Talitrus saltator* (Amphipoda, Talitridae) *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **76**, 377-389.
- Waterman, TH & Horch, KW** 1966. Mechanism of polarized light perception. *Science*, **154**, 467-475.
- Wehner R.** 1981 Spatial vision in arthropods . In: *Handbook of sensory physiology*. (Ed.H. Autrum) pp. 287-616, Vol. **VII/6C**. Vision in Invertebrates Berlin-Heidelberg: Springer Verlag.
- Wehner R.** 1992. Arthropods. In: *Animal homing*. (Ed. F. Papi), pp 45-144. Chapman & Hall London, New York, Tokio, Melbourne, Madras,
- Wehner R.** 1997. The ant's celestial compass system: spectral and polarization channels In: *Orientation and Communication in Arthropods* (Ed. M. Leher) pp. 145-185, BirkhauserVerlag Basel, Switzerland.
- Wehner R. & Strasser. S.** 1985. The pol area of the honey bee's etc: Behavioural evidence *Physiol. Entomol.*, **10**, 337-349

CAPITOLO 6

IS IT THE SUN OR THE MOON?

Alberto Ugolini¹, Giuditta Galanti¹, Luca Mercatelli²

¹ Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, via Romana 17, 50125, Firenze,
Italy

² Istituto Nazionale di Ottica Applicata - CNR, Largo Enrico Fermi, 6, 50125,
Firenze, Italy

In preparation

SUMMARY

To return to the ecologically optimal zone of the beach, sandhoppers and many others species of littoral arthropods maintain a constant sea-land direction based on the sun and moon compasses³. Therefore, for them it is crucial to discriminate between the sun and the moon. In fact, we should understand why clock-shifted (inverted) sandhoppers tested under the sun (i.e. during their subjective night) and under the full moon (during their subjective day) still exhibit seaward orientation in accordance with correct identification of the sun and moon. Releases under natural and artificial conditions of illumination show that a new celestial orientating cue (the skylight gradient of luminance) allows the sandhoppers to identify the sun and therefore to discriminate between the sun and the moon.

Keywords: orientation, sandhopper, sun compass, moon compass, skylight intensity gradient

INTRODUCTION

The sun and the moon are important orienting cues for many species of littoral Arthropods that rely on the sun and moon compasses to maintain the ecologically correct direction (the sea - land axis of the coast) (Pardi & Ercolini, 1986). Therefore, the identification of the sun and the moon is a central task for them, since many species use both these cues to cope with a number of situations in a stressful environment (e.g. dehydration, heating, predation, tides, sea movements). In the past (Papi & Pardi, 1953; Pardi & Papi, 1953) it has been demonstrated that 1) in the sandhoppers, like *Talitrus saltator* both the sun and the moon compasses are used and their relationships investigated as well (Ugolini et al., 1999b; Ugolini, 2003; Meschini et al., 2008). 2) Experiments on the compensation of the apparent movement of the sun demonstrated that the sun compass works even at night (Pardi, 1954; Ugolini et al. 2002) following the “*Talitrus* model”: releases under the sun of clock shifted sandhoppers (12 hours inverted) during their subjective night show that they are able to compensate for the apparent movement of the sun as it comes back to East from West passing from South (Pardi, 1954b; Ugolini et al., 2002). Therefore, the modality for the sun compensation depends from the time of the day and the subjective phase, but it is not so for the sun identification: the sun is always correctly identified during the day and during the (subjective) night (Ugolini et al., 1999b).

However, in the laboratory releases under artificial conditions of illumination that reproduce a scenario with a false sun (or moon) and sky by a white (opaline) Plexiglas dome (Ugolini et al. 1998; Ugolini et al. 2005) we obtained different results. The correct direction based on solar orientation of sandhoppers tested during the day was obtained only when the illumination of

the artificial sun and sky overcame a threshold (1 and 5.7 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ respectively). When tested at night, sandhoppers constantly show a good orientation based on the moon compass whatever the levels of intensity of artificial moon, sun, and sky are (Ugolini et al., 2005). These results indicate that the moon orientation seems to be independent on the intensity of illumination.

Recently (Ugolini et al., 2009) we found a new celestial compass orienting factor used by sandhoppers in direction finding (i.e. the sea - land direction of their home beach). We identified this factor with the skylight intensity gradient. Sandhoppers are neither homers nor central place foragers like bees or ants: they use a unidirectional, non-vectorial orientation to return to a planar goal, like the damp belt of sand frequented by sandhoppers during the day. Therefore, it would not be surprising if they use some celestial orientation cues that allow a less precise directional choice than that used by other animals with different spatio-temporal problems to solve (see also Ugolini 2003). At the same time, however, it is of central importance to discriminate between the sun and the moon.

Here we show how sandhoppers are able to discriminate between the sun and the moon: for them and for many species of ecotonal arthropods the problem is crucial for their survival

MATERIALS AND METHODS

Adult individuals of *T. saltator* (Montagu) were collected from a beach in the Natural Park of Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli (Pisa, Italy) (43° 75' N, 10° 30' E) in the summer 2008 and 2009. The sea-land direction of the Y-axis (perpendicular to the shoreline) is 264°-84°.

After their capture, the sandhoppers were transferred to the laboratory and kept in Plexiglas boxes containing wet sand in conditions of room temperature and an artificial photoperiod (L:D) corresponding in phase and duration to the natural one. Food (universal dried food for fish, SERA Vipar) was constantly available. The animals have been tested within 20 days from the capture.

To phase shift of 12 hours (inversion) the chronometric mechanism that regulates the compensation of the apparent motion of the sun, a group of sandhoppers was kept in a room with the constant temperature of 20 °C, for 15 days with an artificial photoperiod (L:D = 12:12) inverted with respect to the natural one: sunrise at 18:00 PM, sunset at 6:00 AM.

The experiments were conducted in Florence (43° 46' N, 11° 15' E), from 9 to 10 a.m., with the sun at 39° of solar zenithal distance and during night from 9 to 12 p.m. both in condition of full moon (moon phase: 100%) (releases carried out with natural moon and sky) and new moon (moon phase: 0%) (releases in laboratory conditions).

We carried out two different types of releases:

- In natural condition of illumination with the natural sun/moon and sky

- In laboratory with the illumination of sun/moon and sky reproduced artificially

The experimental apparatus used for the first kind of releases was similar to the one used by Pardi & Papi (1953), slightly modified (Ugolini & Macchi, 1988). The device used both for Controls trials and night tests with clockshifted animals consisted of a transparent Plexiglas bowl (h: 5 cm, Ø: 20 cm) set on a goniometer placed on a circular transparent Plexiglas plate (Ø: 30 cm) set horizontally on a tripod. A white Plexiglas screen (h: 5cm, Ø: 30 cm) placed around the bowl blocked the view of the surrounding landscape but allowed vision of the sun/moon and sky. Moreover, for the tests carried out during the morning, we used the same apparatus described previously but we placed a opaline white Plexiglas dome (Ø: 80 cm, or Ø: 30 cm) covered by a gelatin blue filter (Moonlight Blue n°. 183, Spotlight, Milan) over the bowl containing the animals, which prevented vision of the sun and the sky.

The laboratory treatments were carried out using the device described by Ugolini et al. (1998). The bowl containing the animals was covered by a white (opaline) Plexiglas dome (80 cm diameter). The glazed internal surface of the dome (artificial sky) was illuminated by a fibre-optic illuminator (Schott KL1500) allowing the selection of five values of light intensity. The end of the fibre bundle (8 mm diameter) was housed in a tube at the centre of the bowl so that the light source was as close as possible to the centre of the dome. To render the illumination even more uniform, the end of the fibre was equipped with a negative lens (diameter = 21 mm, focal length = 11.7 mm). In order to recreate the light intensity gradient inside the dome we placed an hemisphere of gelatine grey filter (Medium Grey n°. 110, Spotlight, Milan) on the fibre that simulate the sky. A second fibre-optic illuminator, similar to the first one, was used to simulate the astronomic orienting cue. For this purpose, the dome was provided with an aperture, located at 45° above the horizon, in which was inserted the end of the fibre bundle (diameter = 4.5 mm).

The animals have been tested both in dry condition (DTF for solar orientation: 264°) (test during the day and laboratory experiments) and in wet condition (DTF for solar orientation: 84°), putting natural seawater in the bowl where the animals were released (experiments during the night in natural condition of moon and sky).

Statistical Methods

Statistical analysis of the circular distributions was carried out with the methods reported by Batschelet (1981). The mean resultant vector was calculated for each distribution. V-test was used to ascertain whether the distribution differed from uniformity ($P < 0.05$ at least).

Characterization of the experimental devices

The conformation and the material of the dome alter the natural skylight polarized pattern. In order to eliminate the sky spectral gradient a blue filter (380-560nm) was superimposed to the dome. The spectral luminance was

measured by means of a spectroradiometer (Minolta, CS1000) along the solar meridian in steps of 10 deg. The spectroradiometer was placed on a stand below the dome, in the position occupied by the bowl, and pointed to the interior of the dome. The same set-up was used for natural sky measurements, once the dome was removed. In laboratory conditions a neutral density filter screened out half of the artificial sky in order to reproduce the luminance ratio between solar (lunar) and antisolar (antilunar) hemidomes when they are exposed to natural conditions of sun and sky (the half of artificial sky containing the false sun (moon) out of the luminance recorded in the other half). The luminance ratio, measured along solar meridian, between two points placed 50° above the horizon in the solar half of the sky and in the other half is 35000/2800 cd/m² (ratio 12.5) for natural sky, 1390/440 cd/m² (ratio 3.2) in the dome exposed to natural condition of sun and sky, and 86/21 cd/m² (ratio 4.1) in the dome under laboratory artificial conditions. It decreases to 0.08/0.03 cd/m² (ratio 2.7) for natural sky at night with full moon visible and 16.5/8.8 cd/m² (ratio 1.9) for artificial night sky. The difference between the two half of the sky is similar in the artificial set-up with neutral density filter and with the dome under natural illumination (ratio 4.1 and 3.2 respectively), while in open sky it is much greater (12.5). In night natural sky the hemidomes ratio is similar to the related artificial condition (2.7 and 1.9 respectively), while it is always less than artificial day conditions: the luminance ratio between hemidomes in fact is very high in natural day conditions while is nearly negligible at night.

RESULTS

Despite the clock shifting (12 hours inverted), individuals released at night (i.e. during their subjective day) under full moon show a mean direction in agreement with the expected direction based on a moon compass orientation at night (Fig.1A). However, in one case we registered a mean direction in agreement with the seaward orientation for the moon compensation during the day (Fig.1B).

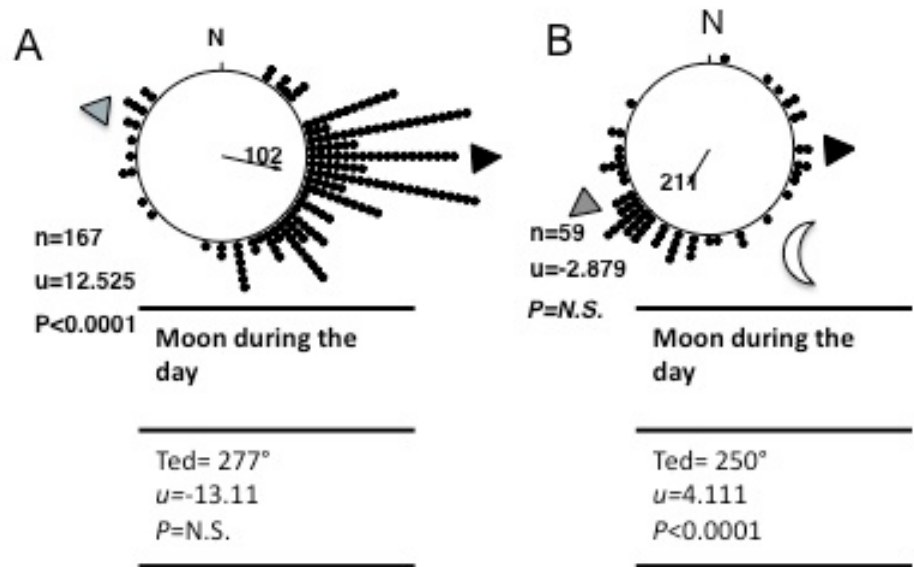


Figure 1 Releases in natural conditions. A, B releases of clock shifted sandhoppers in sea water with natural condition of moon and sky (moon phase:100%). Black triangle landward direction; grey triangle expected direction for moon during the day; moon, azimuth of the moon at the time of the experiment; dots, directions of sandhoppers (one per dot); black arrow, mean vector and angle (the length of the mean vector range from 0 to 1 = radius of the circle); n, sample size; u, V-test with the probability level P.

Non clock shifted individuals released during the day under a translucent (opaline) white Plexiglas dome covered by a gelatin blue filter, without the direct vision of the sun disc and without any other celestial orienting cue, but the skylight intensity gradient, show the predicted orientation towards the sea (Fig.2A, B).

To test our hypothesis on the role of the skylight intensity gradient on the discrimination between sun and moon, we reproduced, inside the dome, an artificial illumination gradient similar to that we found under the dome in natural conditions of sun and sky: the dome under natural conditions and the dome under artificial illumination have almost the same luminance ratio, although they differ for the absolute luminance levels.

Results of tests under the above (night experiments with artificial illumination, under the dome), show no longer a moon orientation as obtained in the controls test (Fig.2C), indeed sandhoppers show a clear orientation towards the expected direction for the sun at night (Fig.2D) even when the artificial sun is switched off (Fig.2E).

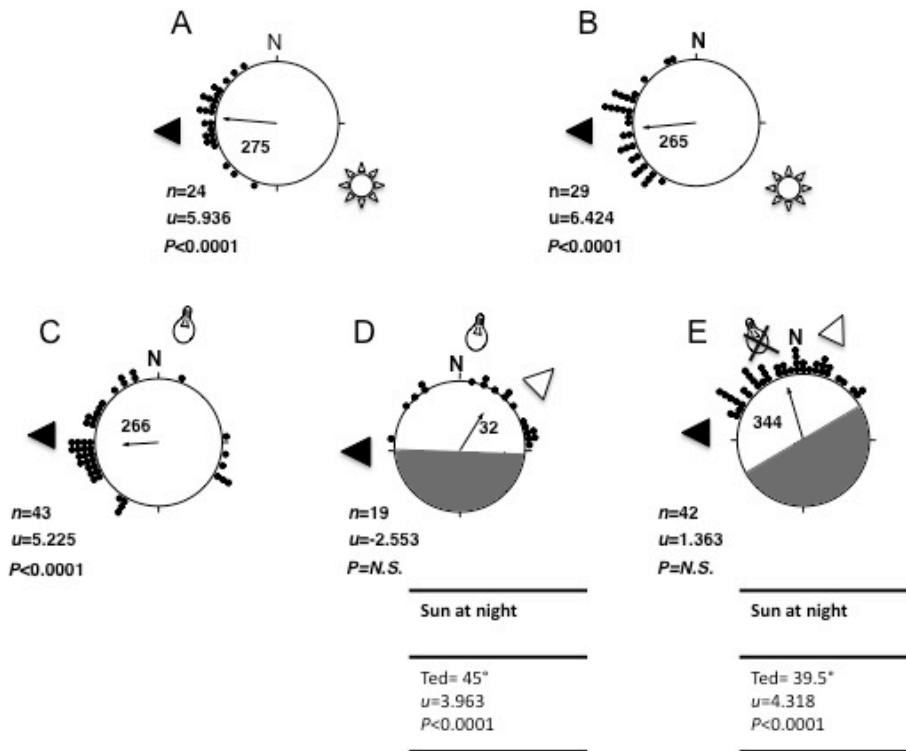


Figure 2 Releases in natural and artificial conditions A, controls with vision of natural sun and sky. B, releases under the opaline Plexiglas dome covered by the gelatin blue filter. C, releases of control in artificial condition of illumination (moon/sun: $68 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, artificial sky: $172.125 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). D, releases in artificial condition of illumination with the sun switched on and the intensity gradient reproduced under the dome, (moon/sun: $68 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, artificial sky: $83.8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). E, releases in artificial condition of illumination with the sun switched off and the intensity gradient reproduced under the dome, (moon/sun: $0 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, artificial sky: $83.8 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). Black triangle seaward direction; white triangle expected direction for sun at night; sun, azimuth of the sun at the time of the experiment; lamp, position of the artificial sun/moon; grey hemicycle, position of the grey gelatin filter. For further informations see fig. 1.

DISCUSSION

It is evident that results of clock-shifted individuals released at night under the moon, during their subjective day are not perfectly consistent. In fact even though the most part of releases show a directional choice based on moon

compass at night, in one case the sandhoppers orientation indicates a moon orientation during the day. We should underline that in both cases the moon was identified as the moon as it is. The difference between the two results could be due to a difference in the effect of the clock shifting treatment. It is demonstrated, in fact, that the traditional clock shifting for the sun compass chronometric mechanism (i.e. the phase shift fast or slow of the light : dark photoperiod with respect to the natural one) does not affect the chronometric mechanism for the compensation of azimuthal variations of the moon (Ugolini et al., 1999b). The most part of these releases clearly show that the L:D phase shifting did not alter the chronometric mechanism of the moon compass. Then, this result supports the previous findings that demonstrate the independence of the chronometric mechanisms: one for the sun and one for the moon (Ugolini et al., 1999b). This is in contrast with the results obtained by Meschini et al. (2008) that, despite a great dispersion characterising the most part of the distributions, seem indicate that the Light : Dark phase shifting not only affects the chronometric mechanism of the sun compass, but also the chronometric mechanism of the moon compass. On the other hand, we must stress that in someone of our experiments inverted sandhoppers seem to compensate for the azimuthal variation of the moon during the day. Therefore their moon compass chronometric mechanism seems to be phase shifted and therefore it does not seem separated by the chronometric mechanism of the sun compass, in agreement with the findings by Meschini et al (2008). In fact, at the moment we do not have any reliable explanation for these contrasting results. However, we must underline that the most part of our results are consistent with our previous findings (Ugolini et al., 1999b) and indicate the existence of two separate chronometric mechanisms for the two compass systems and, what is interesting for the purpose of this paper, in both cases the moon has been identified as it is independently from the subjective L:D phase of sandhoppers.

Moreover, the identification of the moon based on the absence (or a very reduced presence) of the gradient of light intensity and its independence from the intensity of the light source, is indirectly confirmed by the results of previously conducted experiments in which the moon was replaced by an electric torch (Papi 1960, Ugolini et al 1999b; Ugolini 2003) without regard to intensity of light to which sandhoppers were subjected.

It is well known since many years (Pardi, 1954) that the sun is identified as it is by sandhoppers released under the sun during their subjective night. Moreover, releases under the dome in natural conditions of illumination confirm that the skylight intensity gradient can be used as a compass orienting cue, even when the solar disc is not directly visible (Ugolini et al., 2009). Finally, releases in artificial condition of illumination with the sun switched on/off and the intensity gradient reproduced under the dome confirm the importance of the intensity gradient in the sun identification even at night.

This is true despite the luminance ratio under the artificial sky between the half dome containing the sun (solar hemidome) and the opposite one (antisolar hemidome) is lower than that one of the natural sky.

The presence/absence of the skylight intensity gradient explain the apparent contrast concerning the importance of the L:D phase in the identification of the moon comparing the results of laboratory releases and releases under natural conditions of sun/moon and sky: sandhoppers tested at night during their subjective day do not identify the moon as the sun since there is no (or very weak) skylight intensity gradient. In fact, the sun is identified by sandhoppers independently from their subjective L:D phase, by the presence of the skylight intensity gradient. All the other point sources are identified as the moon independently from their intensity, especially at night. Finally, we like to stress, that our results do not exclude the presence of a colour gradient compass in sandhoppers, as demonstrated in ants and bees (Rossel and Wehner, 1986; Wehner, 1997, see also Jensen 2009)

References

- Batschelet, E.** 1981. Circular Statistics in Biology. London: Academic Press.
- Jensen, K.K.** 2009. Light-dependent orientation responses in animals can be explained by a model of compass cue integration. *J. Theor. Biol.* In press.
- Meschini, E., Gagliardo, A. & Papi, F.** 2008. Lunar orientation in sandhoppers is affected by shifting both the moon phase and the daily clock. *Anim. Behav.* **76**, 25-35.
- Papi, F.** 1960. Orientation by night: the moon. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **25**: 475-480.
- Papi, F. & Pardi, L.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). II Sui fattori che regolano la variazione dell'angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte. L'orientamento diurno di altre popolazioni. . *Z. vergl. Physiol.* **35**, 490-518.
- Pardi, L.** 1954. Esperienze sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda): l'orientamento al sole degli individui a ritmo nictimerale invertito, durante la "loro notte". *Boll. Ist. Mus. Zool. Univ. Torino* **4**, 127-134.
- Pardi, L. & Ercolini, A.** 1986. Zonal recovery mechanisms in talitrid crustaceans. *Boll. Zool.* **53**, 139-160 .
- Pardi, L. & Papi, F.** 1953. Ricerche sull'orientamento di *T. saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). I. L'orientamento durante il giorno in una popolazione del litorale tirrenico. *Z. vergl. Physiol.* **35**, 459-489 .
- Rossel S. & Wehner R.** 1986. Polarization vision in bees. *Nature*, **325**, 128-131.
- Ugolini, A.** 2003. Activity rhythms and orientation in sandhoppers (Crustacea, Amphipoda). *Front. Biosci.* **8**, 722-732.

- Ugolini, A. & Macchi, T.** 1988. Learned component in the solar orientation of *T. saltator* (Montagu) (Crustacea, Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **121**, 79-87.
- Ugolini A., Boddi, V., Mercatelli, L. & Castellini, C.** 2005. Moon orientation in adult and young sandhoppers under artificial light. *Proc. R. Soc. Lond. B* **272**, 2189-2194.
- Ugolini, A., Galanti, G., Mercatelli, L.** 2009. Difference in skylight intensity is a new celestial cue for sandhopper orientation (Amphipoda, Talitridae). *Anim. Behav.* **77**, 171-175.
- Ugolini, A., Melis, C., Innocenti, R., Tiribilli, B. & Castellini, C.** 1999b. Moon and sun compasses in sandhoppers rely on two separate chronometric mechanisms. *Proc. R. Soc. Lond. B* **266**, 749-752
- Ugolini, A., Tiribilli, B. & Boddi, V.** 2002. The sun compass of the sandhopper *Talitrus saltator*: the speed of the chronometric mechanism depends on the hours of light. *J. Exp. Biol.* **205**, 3225-3230.
- Ugolini, A., Tiribilli, B. & Castellini, C.** 1998. Artificial light and sun compass orientation in the sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea, Amphipoda). *J. Comp. Physiol. A* **182**, 43-50.
- Wehner, R.** 1997. The ant's celestial compass system: spectral and polarization channels. In *Orientation and communication in arthropods* (ed. M. Lehrer) pp. 145–185. Birkhäuser, Basel.

CONCLUSIONI GENERALI

L'anfipode sopralitorale *Talitrus saltator* (Montagu) è considerato sin dagli anni '50 un buon modello biologico per gli studi nel campo dell'orientamento. È noto che per fare ritorno alla zona di elezione seguendo la via più breve i talitri utilizzano principalmente stimoli di natura visiva sia locali (paesaggio) ma soprattutto universali (fattori astronomici, fattori celesti). Gli stimoli non visivi come la pendenza del substrato o il campo magnetico terrestre sono infatti considerati in questa specie secondari e vengono utilizzati principalmente quando gli stimoli visivi non sono disponibili.

I risultati di questa tesi mostrano per la prima volta in modo diretto sia attraverso prove comportamentali che elettrofisiologiche come *T. saltator* sia in grado di percepire la luce UV (Capitolo 2). Tuttavia rimane ancora da chiarire la relazione tra questa capacità e l'utilizzo di fattori orientanti celesti. Studi condotti principalmente su api e formiche, ma anche su altri artropodi (per una revisione si veda Horváth e Varjú, 2004) hanno mostrato che, spesso, la percezione della luce UV è strettamente correlata con la percezione del pattern di polarizzazione celeste in quanto i recettori per l'UV sono gli stessi in grado di percepire la luce polarizzata. Le indagini effettuate circa la percezione e l'utilizzo del pattern di polarizzazione celeste (Capitolo 3) mostrano come la luce polarizzata potrebbe essere percepita dai talitri, tuttavia questa non sembra essere utilizzata come riferimento orientante bussolare. Infatti talitri saggati in presenza del pattern di polarizzazione celeste modificato artificialmente continuano ad orientarsi verso la DTF attesa per l'orientamento solare.

Tra i fattori orientanti celesti il gradiente di intensità luminosa esistente lungo il meridiano solare si configura come un importante e nuovo stimolo orientante utilizzato da *T. saltator* nel meccanismo di recupero zonale (Capitolo 4).

I risultati ottenuti saggiando talitri con la regione ventrale e dorsale degli occhi oscurata non hanno fornito prove circa la presenza di una regionalizzazione dei pigmenti visivi nei talitri (Capitolo 5). Nonostante questo tipo di indagine necessiti di essere maggiormente approfondita, sembra che la regione dorsale dell'occhio presenti, rispetto a quella ventrale, una maggiore sensibilità verso la luce con lunghezza d'onda corta (UV-Blu). I saggi di scelta binaria hanno inoltre confermato la percezione delle lunghezze d'onda Blu e Verde ed hanno evidenziato l'andamento della risposta fototattica nei confronti dell'intensità per queste due lunghezze d'onda (Capitolo 5).

I saggi effettuati ricreando in condizioni di laboratorio (illuminazione di cielo e sole artificiale) un gradiente di intensità luminosa analogo a quello presente nel cielo in condizioni naturali (Capitolo 6) hanno mostrato come questo fattore sia alla base del meccanismo di identificazione di sole e luna.

BIBLIOGRAFIA

Horváth G. & Varijú D. 2004. Polarization light in animal vision. Polarization patterns in nature. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

